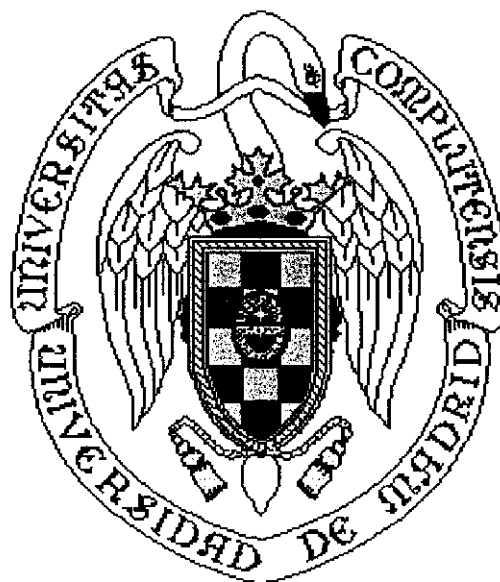


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO
DE EFLUENTES DE QUESERÍA**

TESIS DOCTORAL

María Isabel Berruga Fernández

Madrid, 1999

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III
(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)

DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE
EFLUENTES DE QUESERÍA

Memoria que para optar al
grado de Doctor en Veterinaria
presenta la Licenciada María
Isabel Berruga Fernández.

Madrid, julio de 1999



TELF. 34 - (9) 1 - 394 37 49
FAX: 34 - (9) 1 - 394 37 43

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

CARMEN SAN JOSÉ SERRÁN Y ALMUDENA JASPE RODRÍGUEZ, PROFESORA CATEDRÁTICA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS Y PROFESORA ASOCIADA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III (HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS), RESPECTIVAMENTE, DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Desarrollo de procedimientos para el tratamiento de efluentes de quesería”**, de la que es autora la Licenciada María Isabel Berruga Fernández, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de las que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 20 de julio de 1999.

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

Carmen San José Serrán

Almudena Jaspe Rodríguez

A mis padres

A mi abuelo

"Decía un amigo mío, [...], que había que intentar todos los caminos, asomarse a todos los mares, llamar a todas las puertas"

C.J. Cela

"Una de las últimas esperanzas es sencillamente que paréis los motores y os detengáis a oír la canción de la vida. Porque sí, porque suena bien, y pone la piel a punto para las caricias de la libertad."

J. Araujo

Quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Juan Antonio Ordoñez Pereda, Director de este Departamento, por darme acogida en este centro y facilitarme la realización de esta Tesis Doctoral.

A las directoras de esta Tesis, por haberme iniciado en el mundo de la investigación; por su apoyo y amistad en todo momento. A Carmen, sin cuya dirección y enseñanzas esta Tesis no habría llegado a buen término. Gracias a Almudena por sus consejos, por su inagotable actividad, y sobre todo por el día a día, porque aportando con sus conocimientos, su pequeño, pero incansable, granito de arena consigue despertar la chispa científica que hay en todos los que le rodean.

También quiero dar las gracias a las queserías Lácteas del Jarama, Forlasa y Cooperativa de Ganaderos Manchegos, por proporcionarme parte de las muestras utilizadas en este trabajo, y en especial a los veterinarios Dr. Mario Román, Carlos Calvo y Javier Pastor.

Deseo agradecer a D. José Antonio de las Heras, Jefe de la Sección de Estaciones De Regeneración de Aguas Residuales del Ayuntamiento de Madrid, su disposición para facilitarme el acceso a varias plantas EDAR pertenecientes al Plan de Saneamiento Integral de Madrid, y al personal de las depuradoras de Valdebebas y La China.

A Esther Valero, Isabel Martínez y a Gregorio Kafelis por sus aportaciones analíticas.

Asimismo, agradezco a D. Pedro Valentín Gamazo (miembro de la FENIL) y a D. Miguel Angel Marín Alba (Jefe de sección del Área de Control y Tecnología del Ministerio de Medio Ambiente) el grato trato y su inestimable información sobre la problemática nacional del sector lácteo.

A Juan y a Juanra (auténticos topos ministeriales), a Pili y a Mercedes, por su apoyo y comprensión, y en especial por su amistad, que de no haber realizado este trabajo jamás habría surgido.

A mis amigos de Albacete por haber sobrellevado mis angustias con paciencia y comprensión, y a M^a Luz, compañera de fatigas (verás que pronto te toca a ti).

A mi hermano Tomás, por su apoyo incondicional y por sacarme de todos los fiascos propiciados por mi ignorancia informática.

Quiero agradecer a todos los miembros de este Departamento su amistad y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio por el día a día que hemos compartido, Eduardo, Guiomar, Tomás, Carmencita, y en especial, a Begoña, que además de ser una gran compañera, ha demostrado ser una excelente conductora, de insuperables destrezas en el arte de la serología manchega y del moldeado artístico, y sobre todo por ser una amiga.

A Esther, Youssef, y a los ya doctores Maribel y Adrián, auténticos aliados en la batalla contra las letras y los atropellos informáticos, por compartir durante un año la fatigable tarea de La Escritura y durante cuatro el mejor de los regalos, La Amistad.

A Isabel Cambero por estar siempre dispuesta a aclarar todas mis dudas tecnológicas, a Ana Haza, por sus buenos consejos electrónicos, a María Marín y Manuela, a Shangs, Sergio, Victor y Rosalba que nunca olvidaré aunque nos separen unos cuantos centímetros de tierra y mar. Siempre guardaré un rinconcito en mi corazón para mis vecinitos LAB, Ana Suárez, Jose Mari y Carmen, y para Alicia, Adriana, Ana Céspedes, Yolanda, Luis, Antonio, María Blanco, Jose Bruna, Elena, Bea y Matilde.

Finalmente, quiero agradecer a la Junta de Castilla-La Mancha, la concesión de una beca para la formación de doctores para la realización de esta Tesis; y a la comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) la financiación de este trabajo, incluido en el proyecto de Investigación ALI 96/0939.

	<i>Pág.</i>
<i>Índice</i>	<i>i</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>vii</i>
I. INTRODUCCIÓN	
1. Aspectos medioambientales de la actividad industrial	1
1. 1. Contexto social y normativo	1
1. 2. Problemática medioambiental del sector agroalimentario, en comparación con otras actividades industriales	5
1. 3. Pautas para la caracterización de residuos y medida de la contaminación que producen	8
2. Subproductos alimentarios y sus formas de aprovechamiento	15
2. 1. Subproductos de origen vegetal	16
2. 2. Subproductos de origen animal	20
2. 3. El suero de quesería como subproducto	24
2. 3. 1. Producción de suero a nivel mundial, europeo y español	24
2. 3. 2. Composición de los principales tipos de suero de quesería	26
2. 3. 3. Principales formas de aprovechamiento del suero de quesería	31
2. 3. 3. 1. Utilización del suero completo	32
2. 3. 3. 2. Utilización del suero fraccionado	38
a. Proteínas	39
b. Lactosa	41
2. 3. 3. 3. Tasas de aprovechamiento del suero de quesería	44
3. Residuos alimentarios	46
3. 1. Residuos sólidos	46
3. 2. Residuos líquidos	47
3. 2. 1. Residuos líquidos de origen vegetal	47
3. 2. 2. Residuos líquidos de origen animal	51
4. Tratamiento de residuos alimentarios	60
4. 1. Residuos sólidos	60
4. 2. Residuos líquidos	61
4. 2. 1. Tratamientos físico-químicos	62
4. 2. 2. Tratamientos biológicos	68
	<i>Pág.</i>

	<i>Pág.</i>
4. 2. 2. 1. Tratamientos aerobios	69
4. 2. 2. 2. Tratamientos anaerobios	75
4. 2. 2. 3. Tratamientos combinados	81
4. 3. Vertidos lácteos	82
5. Levaduras en medios lácteos	95
5. 1. Levaduras que utilizan lactosa: principales géneros y especies	95
5. 2. Levaduras deseables en quesos y leches fermentadas	99
5. 3. Levaduras contaminantes en instalaciones y productos lácteos	101
5. 4. Rutas aerobias y anaerobias de utilización de lactosa	103
5. 4. 1. Transporte	104
5. 4. 2. Hidrólisis	106
5. 4. 3. Metabolismo intermediario	107
5. 4. 4. Utilización aerobia y anaerobia de azúcares en distintas levaduras	109
5. 5. Rutas de utilización de nutrientes nitrogenados	110
5. 6. Floculación de levaduras	113
5. 7. Procesos de bioconversión utilizando levaduras	115
6. Características y aplicaciones industriales de lactasa	122
6. 1. Características de la enzima de diversas fuentes. Formas comerciales	122
6. 2. Aplicaciones de la hidrólisis: objetivos pretendidos y otras consecuencias	128
II. OBJETIVOS	133
III. MATERIAL Y MÉTODOS	137
1. Levaduras	139
2. Otros microorganismos	139
3. Suero dulce y su permeado	140
4. Efluentes lácteos	143
4. 1. Quesería “Cooperativa de Ganaderos Manchegos”	144
4. 2. Quesería “Lácteas del Jarama”	144
4. 3. Quesería “Forlasa”	144
5. Aguas residuales urbanas	145
5. 1. Depuradora ERAR Valdebebas	145

	<i>Pág.</i>
5. 2. Depuradora ERAR La China	145
6. Material general de laboratorio	146
7. Reactivos	148
8. Cultivos	148
8. 1. Medios de cultivo	148
8. 1. 1. Caldo para levaduras y mohos (YM)	148
8. 1. 2. Caldo YPD	149
8. 1. 3. Agar para levaduras y mohos (YMA)	149
8. 1. 4. Agar de extracto de malta suplementado con oxitetraciclina (OMEA)	149
8. 1. 5. Agar Rosa-Bengala Cloranfenicol (RBC)	150
8. 1. 6. Agar para recuento en placa (PCA)	150
8. 1. 7. Agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS)	151
8. 1. 8. Agar Man, Rogosa, Sharpe-ácido sórbico (MRS-S)	151
8. 1. 9. Agar-ácido sórbico (LaS)	151
8. 1. 10. Agar MacConkey (púrpura)	152
8. 1. 11. Permeado de suero dulce	152
8. 1. 12. Permeado con la lactosa hidrolizada	152
8. 1. 13. Suero dulce	153
8. 2. Condiciones de cultivo	153
8. 3. Toma de muestras	155
8. 4. Estimación del crecimiento de los microorganismos	155
9. Obtención de flora microbiana de aguas residuales urbanas	157
10. Aislamiento e identificación de levaduras	157
10. 1. Aislamiento de levaduras a partir directamente de efluentes lácteos	157
10. 2. Aislamiento de levaduras adaptadas a permeado	158
10. 3. Selección de levaduras	158
11. Análisis post-cultivo de sueros y permeados	159
11. 1. Determinación de proteínas	159
11. 2. Determinación de nitrógeno total	159
11. 3. Determinación de los sólidos totales, sólidos disueltos y biomasa	160
11. 4. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)	160

	<i>Pág.</i>
11. 5. Determinación del Carbono Orgánico Total (COT) y del Carbono Inorgánico Total (CIT)	161
11. 6. Determinación de compuestos orgánicos solubles	162
11. 6. 1. Toma de muestras	164
11. 6. 2. Análisis de compuestos orgánicos por GC-MS	164
11. 6. 3. Identificación de los compuestos	164
11. 7. Determinación enzimática de compuestos de bajo peso molecular	164
11. 7. 1. Preparación de las muestras	164
11. 7. 2. Ensayos enzimáticos	165
12. Determinación de la actividad lactásica intra- y extracelular	166
12. 1. Preparación y conservación de las muestras	166
12. 2. Permeabilización de las células	166
12. 3. Actividad lactásica	168
13. Determinación de la capacidad floculante de las levaduras	168
14. Determinación de la capacidad de sedimentación de las levaduras	169
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 171
1. Tratamiento aerobio de permeado de suero lacto-hidrolizado con flora de aguas residuales urbanas	173
1. 1. Hidrólisis con β -galactosidasa comercial	173
1. 2. Productos de la hidrólisis	174
1. 3. Efecto de la hidrólisis del permeado sobre los cultivos aerobios con inóculo de aguas residuales	176
1. 3. 1. Efecto sobre la flora	176
1. 3. 2. Efecto sobre las fuentes de C y la DQO	180
1. 3. 3. Efecto de la regulación del pH sobre la DQO	185
1. 3. 4. Efecto de la suplementación con hierro sobre la DQO	188
1. 3. 5. Formación de ácidos orgánicos, etanol y glicerol	190
2. Utilización de levaduras como pretratamiento en la depuración de suero y de su permeado	197
2. 1. Evaluación y adaptación de métodos	197

	<i>Pág.</i>
2. 1. 1. Elección de medios selectivos para recuentos de levaduras y bacterias lácticas	197
2. 1. 2. Permeabilización y conservación de células para el ensayo de la actividad lactásica	200
2. 2. Estudio básico de las levaduras y aguas residuales	206
2. 2. 1. Cepas procedentes de las colecciones británica y española	206
2. 2. 1. 1. Velocidad de crecimiento y consumo de lactosa	207
2. 2. 1. 2. Floculación de las cepas de colección	212
2. 2. 2. Cepas procedentes de las aguas residuales de quesería	214
2. 2. 2. 1. Obtención y selección de cepas de aguas residuales. Consumo de lactosa	214
2. 2. 2. 2. Floculación de las cepas aisladas de aguas residuales	218
2. 2. 2. 3. Clasificación	220
2. 2. 3. Características de las aguas residuales de las tres queserías	225
2. 3. Caracterización de las levaduras seleccionadas y su eficacia en depuración	228
2. 3. 1. Actividad lactásica	228
2. 3. 2. Consumo de azúcares vs. DQO	235
2. 3. 2. 1. Cultivo en permeado	235
2. 3. 2. 2. Cultivo en permeado suplementado	242
2. 3. 3. Sedimentación espontánea	245
2. 3. 4. Crecimiento en suero	247
2. 4. Optimización en fermentador de los cultivos en permeado	256
2. 4. 1. Aireación forzada	257
2. 4. 2. Suplementación con nitrógeno y fósforo	262
2. 4. 3. Suplementación con hierro	264
V. CONCLUSIONES	267
VI. BIBLIOGRAFÍA	273
NORMATIVA MEDIOAMBIENTAL CITADA	313

ABREVIATURAS

AF-: Cepas Aclimatadas de Quesería Grande

AJ-: Cepas Aclimatadas de Quesería Mediana

AOAC: Association of Official Analytical Chemists (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)

AT-: Cepas Aclimatadas de Quesería Pequeña

ATYCA: Iniciativa de Apoyo a la Tecnología, la Seguridad y la Calidad Industrial

BATs: Best Available Techniques (Mejores técnicas disponibles)

BSA: Bovine Serum Albumin (Seroalbúmina bovina)

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CIP: Cleaning In Place (Limpieza *in situ*)

CIT: Carbono Inorgánico Total

CMA: Calcium Magnesium Acetate (Acetato Cálcico Magnésico)

CMP: Caseín Macropéptido (también denominado glicomacropéptido)

COT: Carbono Orgánico Total

CTAB: Bromuro de Cetiltrimetilamonio

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno

DBO_n: Demanda Bioquímica de Oxígeno (en n días)

DBOC: Demanda Bioquímica de Oxígeno Carbonosa

DBON: Demanda Bioquímica de Oxígeno Nitrogenada

DF-: Cepas de Aislamiento Directo, de Quesería Grande

DJ-: Cepas de Aislamiento Directo, de Quesería Mediana

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DT-: Cepas de Aislamiento Directo, de Quesería Pequeña

DTeO: Demanda Teórica de Oxígeno

DTO: Demanda Total de Oxígeno

EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetracético

e-h: Equivalente habitante

EI: Impacto Electrónico

EMP: Vía Embden-Meyerhof-Parnas

ERAR: Estaciones Regeneradoras de Aguas Residuales

FACW: Fermented Ammonium Condensed Whey (Suero amoniacal)

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de Alimentos y Agricultura)

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Fármacos)

FENIL: Federación Nacional de Industrias Lácteas

FIL: Federación Internacional de Lechería

Gal-OS: Galacto-oligosacáridos

GAP: General Amino-acid Permease (Permeasa General de Aminoácidos)

GMP: glicomacropéptido (ver CMP)

GRAS: Generally Recognized As Safe (Sustancias Generalmente Reconocidas como Inocuas)

IDF: International Dairy Federation (ver FIL)

IMAO: Inhibidores de la Monoamino-Oxidasa

IPPC: Prevención y Control Integrados de la Contaminación

ISO: International Standard Organization

LaS: Agar-ácido sórbico

MRS: Agar Man, Rogosa, Sharpe

MRS-S: Agar Man, Rogosa, Sharpe con ácido sórbico

NCYC: National Collection of Yeast Cultures (Colección Británica de Levaduras)

NDIR: Detector No Dispersivo de Infrarrojos

NTA: Ácido Nitrilo Triacético

OMEA: Agar de extracto de malta con oxitetraciclina

ONP: Orto-Nitrofenil

ONPG: Orto-Nitrofenil- β -Galactopiranósido

PCA: Agar para recuento en placa

PE8: Poliéter Sulfona

PITMA: Programa Industrial y Tecnológico de Medioambiente

pO₂: Presión parcial de oxígeno

RBC: Agar rosa-bengala con cloranfenicol

RDPH: Reglamento de Dominio Público Hidráulico

SBR: Sequencing Batch Reactor (Reactor Discontinuo Secuencial)

SCP: Single Cell Protein, Proteína Unicelular

SD: Sólidos Disueltos

SDS: Sodio Dodecil Sulfato

SS: Sólidos en Suspensión

SSV: Sólidos en Suspensión Volátiles

ST: Sólidos Totales

STV: Sólidos Totales Volátiles

TMP: Presión Transmembranal

UASB: Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (Reactor de Manto de Fango Anaerobio de Flujo Ascendente)

u.l.n.: Unidad de lactasa neutra

UHT: Ultra-High Temperature (Esterilización a Alta Temperatura)

v.v.m.: Volumen de aire por volumen de medio por minuto

WPC: Whey Protein Concentrate (Concentrados Proteicos de Suero)

WPI: Whey Protein Isolates (Aislados Proteicos de Suero)

WPP: Whey Protein-hidrolized Peptides (Preparados de Seroproteínas Hidrolizadas)

WPT: Whey Protein Texturizer (Proteínas de Suero Texturizantes)

YM: Caldo para levaduras y mohos

YMA: Agar para levaduras y mohos

YPD: Caldo con Peptona, Glucosa y Extracto de Levadura

I. INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS MEDIOAMBIENTALES DE LA ACTIVIDAD INDUSTRIAL

1. 1. Contexto social y normativo

Ante una percepción más clara y extendida de la necesidad de un entorno ambiental seguro, sostenible y agradable, en la última década del siglo XX se ha acelerado, a nivel mundial, la búsqueda de soluciones a los problemas medioambientales. En este contexto se han organizado por ejemplo, grandes reuniones como la Cumbre de Río de Janeiro en 1992, con más resultados en cuanto a declaraciones de propósitos que en compromisos específicos. A pesar del hasta ahora relativo fracaso en cuanto a la adopción de medidas drásticas y globales a nivel mundial, van abriéndose camino diversas iniciativas para ir progresivamente reduciendo la contaminación de origen industrial, con el estímulo de una mejor imagen social y la ventaja de irse acomodando a una gradual pero inexorable introducción de legislación cada vez más exigente. Así, y para ayudar a las empresas a organizar sus propios sistemas de gestión ambiental, se han ido desarrollando desde 1996 la serie de normas ISO 14.000.

La Unión Europea recogía ya en el artículo 130.R de su Tratado Constitutivo determinados principios de política medioambiental, dirigidos a la prevención, reducción y, si fuera posible, eliminación de la contaminación y a garantizar el uso prudente de los recursos naturales. Con estos objetivos, la UE ha elaborado diversas directivas, incluyendo límites de emisión y leyes encaminadas a la consecución de normas de calidad del medio ambiente, abarcando la atmósfera, las aguas y los suelos y las relaciones entre estos ámbitos. Entre los pasos recientes más significativos están la Directiva 91/156/CEE, transpuesta en la Ley de Residuos (Ley 10/1998) y la Directiva 96/61/CE relativa a la Prevención y al Control Integrados de la Contaminación (IPPC), aún no transpuesta, y que pretende maximizar la eficacia del empleo de los recursos energéticos, y la utilización de las mejores técnicas disponibles, para minimizar la producción de contaminantes y residuos, y si esto no fuera posible, para implantar sistemas de gestión que permitan el reciclado, reutilización o eliminación de los mismos.

La Ley de Residuos, antes mencionada, regula lo referente a residuos distintos de las emisiones atmosféricas, ni residuos radioactivos, ni vertidos a las aguas. Dentro de la Ley

tienen una consideración especial los residuos considerados como tóxicos y peligrosos (regulados en el RD 952/1997). Esta ley obliga al seguimiento de los residuos, incluidos los sólidos urbanos, desde que son generados, así como su posesión, recogida y eliminación, para lograr una gestión adecuada de los mismos, y define las correspondientes responsabilidades y competencias administrativas, y las normas sobre la declaración de suelos contaminados. En relación con los objetivos de esta Ley existen diversas vías de apoyo público para el desarrollo de tecnologías limpias (plan PITMA, ATYCA, etc.) y para la gestión de residuos (como catálogos y bolsas de residuos, etc.).

Los vertidos líquidos están regulados por la Ley de Aguas (Ley 29/1985, de 2 de agosto) y el Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre que es la trasposición de la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de Aguas Residuales Urbanas, para los vertidos a cauce público y a red de saneamiento, respectivamente. La Ley de Aguas se desarrolla en dos Reglamentos, el de la Administración Pública del Agua y Planificación Hidrológica (RD 927/1988, de 29 de julio) que amplía los títulos II y III de la Ley, y el Reglamento del Dominio Público Hidráulico (RDPH) (RD 849/1986, de 11 de abril), derivado de los títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII.

Este último, en su título III “De la protección del dominio público hidráulico y de la calidad de las aguas continentales”, desarrolla el título V de la ley y prohíbe el vertido directo o indirecto de sustancias que contaminen a las aguas (art. 234.a.), y en su anexo al título IV, establece unos valores límite de vertido (Tabla 1). Asimismo, el RDPH establece el requerimiento de una autorización de vertido para toda actividad susceptible de provocar la contaminación del dominio público hidráulico (art. 245 a 252). Introduce, por otra parte, en su título IV la figura del Canon de Vertido, gravamen económico destinado a la protección y mejora de las aguas de cada cuenca hidrográfica, cuyo importe es función de la carga contaminante. Existe por otra parte, una norma referente a los vertidos al mar, la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas (desarrollada en el Real Decreto 1417/89).

El Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo (desarrollo de parte del RD-L 11/1995) establece en su anexo III los límites de vertido para determinados sectores agroalimentarios (Tabla 1). Por otra parte, y al amparo del artículo 149.1.23ª de la

Constitución Española, algunas Comunidades Autónomas como la de Madrid han publicado sus propias leyes para vertidos y establecido sus propias restricciones (Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales en el sistema integral de saneamiento) (Tabla 1). De igual modo, los ayuntamientos pueden determinar sus propios límites de vertido de acuerdo con sus Ordenanzas Municipales.

Tabla 1. Relación de algunos de los valores límite para los vertidos según diversas normas.

Parámetro	Concentración		
	RDPH (RD 849/1986)	RD 509/1996	Ley 10/1993 (BOCAM, 12/11/93)
Temperatura (°C)	3	-	< 40
pH	5,5-9,5	-	6-9
Conductividad (μS/cm)	-	-	5.000
Aceites y grasas (mg/L)	20-40*	-	100
Sólidos en suspensión (mg/L)	80-300*	35 (optativo)	1.000
DBO₅ (mg/L)	40-300*	25	1.000
DQO (mg/L)	160-500*	125	1.750
Fósforo total (mg/L) (10.000-100.000 e-h)** (> 100.000 e-h)	10-20*	2 1	-
Nitrógeno total (mg/L) (10.000-100.000 e-h) (> 100.000 e-h)	NH ₃ 1/40-1/20* NO ₂ 10-20*	15 10	-

*El Reglamento del Dominio Público Hidráulico establece 3 clasificaciones en función del nivel de contaminación, aquí se presentan los valores máximo y mínimo.

** 1 e-h (equivalente-habitante) es la carga orgánica biodegradable con una DBO₅ de 60 g de O₂/día (RD-L 11/1995)

Por lo que se refiere a la Protección del ambiente atmosférico está la Ley 38/1972 (de 22 de diciembre) y su desarrollo, el Decreto 833/1975 (de 6 de febrero), que establece los niveles de inmisión y emisión de contaminantes, y especifica las actividades industriales potencialmente contaminantes.

La Directiva 96/61/CE está encaminada “a la prevención, reducción y, en la medida de lo posible, la eliminación de la contaminación, actuando preferentemente en la fuente misma, y a garantizar una gestión prudente de los recursos naturales, de conformidad con los principios de que “quien contamina paga” y de la prevención de la contaminación”. Pretende establecer un marco general de prevención y control integrados, y especifica las consideraciones medioambientales que deben atender los titulares de explotaciones, para que se autorice su actividad. Los valores límite de emisión, los parámetros y las medidas técnicas equivalentes deberán basarse en las “mejores técnicas disponibles” (Best Available Techniques, BATs) que serán las que más reduzcan las emisiones y tengan un menor impacto en el conjunto del medio ambiente. Se pretende potenciar el uso de técnicas que aún sin tener en todos los casos por principal objetivo la reducción de la contaminación permitan producir menores cantidades de residuos, eliminar las pérdidas durante el procesado, utilizar sustancias menos peligrosas, desarrollar técnicas de recuperación y reciclado de algunas sustancias, consumir materias primas (incluida el agua) de forma energéticamente eficaz, concebir formas de aprovechamiento para los residuos sólidos en lugar de destinarlos a vertederos, etc.

Se trata pues de poner a punto técnicas cada vez más eficaces en cuanto a aprovechamiento energético y de materias primas, y a minimización de residuos. Una parte de este desarrollo pasa por poner las condiciones (técnicas, higiénicas, etc.) que permitan la valorización de lo que antes sólo eran residuos, “ascendiéndolos” a la categoría de subproductos, susceptibles de aprovecharse como materias primas baratas transformables en productos comerciales. Otras vías pueden ser concentrar los residuos líquidos en menor volumen de sólidos (más baratos de tratar), cambiar de forma aceptable el producto primario para que incorpore componentes no perjudiciales de la materia prima antes descartados, etc. En este contexto se centra el tema de esta tesis, que trata además de aportar soluciones para empresas queseras pequeñas, muy frecuentes en España.

1.2. Problemática medioambiental del sector agroalimentario, en comparación con otras actividades industriales

Los residuos sólidos en la industria alimentaria, en su mayoría restos de la materia prima, todavía poseen un contenido importante en proteínas, carbohidratos, fibra, grasa y sales minerales, que pueden ser aprovechados. Actualmente, la recogida y eliminación de esos residuos es en muchas ocasiones competencia de las autoridades locales, ya que se gestionan como residuos sólidos urbanos.

Los vertidos líquidos alimentarios suelen ser muy diversos, pero de fácil biodegradabilidad; la mayoría de ellos no se consideran peligrosos para la salud del hombre, con la salvedad de que puedan estar fuertemente contaminados con pesticidas o fertilizantes (Tarbox, 1993; Niranján y Shilton, 1994). Frecuentemente, estas aguas poseen un elevado contenido en materia orgánica, fósforo y nitrógeno (Niranján y Shilton, 1994; Amos, 1997); la acumulación de estos nutrientes en lagos o cauces de agua, denominada eutrofización, favorece un crecimiento excesivo de algas y vegetales superiores, que provocan un desequilibrio del conjunto de organismos que habitan el medio acuático y una pérdida en las posibilidades de uso de las aguas y sus cauces.

Una característica común de la industria alimentaria es la gran cantidad de vertidos que genera, ya que el agua se utiliza en muchas operaciones del procesado (limpieza del producto, procedimientos de separación, cocinado, enfriamiento, etc.), en el posterior lavado de las instalaciones, etc. Estas aguas tradicionalmente se mezclan, lo que limita considerablemente sus posibilidades de reutilización.

El empleo de agentes de limpieza y desinfección es otro factor que interfiere en la reutilización y depuración de los efluentes alimentarios. Existen una gran variedad de detergentes y agentes de limpieza alcalinos o ácidos de uso frecuente en la industria alimentaria. El más empleado es probablemente la sosa y sus derivados (Walker y LaGrange, 1983; Troller, 1993). La sosa es barata, una excelente saponificante de grasas y degradadora de proteínas, pero su utilización puede influir de manera importante en la alcalinización de los efluentes. Los ácidos fuertes (fosfórico, nítrico, sulfámico, etc.), a pesar de los riesgos de corrosión, se usan en ocasiones junto con inhibidores de la

corrosión (aminas) para desincrustar depósitos de carbonato cálcico y proteína (IDF, 1994), y a pesar de la dilución pueden alterar la actividad biológica inmediata al punto de vertido. El empleo de secuestrantes, como los polifosfatos, ácido etilen diamino tetracético (EDTA) y el ácido nitrilo triacético (NTA), puede contribuir a la eutrofización. Los compuestos inorgánicos en general aumentan la concentración salina de las aguas. En su lugar, se va introduciendo el uso de ácidos orgánicos (acético, levulínico, cítrico, tartárico, glucónico), más suaves y seguros de empleo, y con acción bacteriostática a concentraciones no muy altas (Walker y LaGrange, 1983; Troller, 1993). La utilización de surfactantes (alcoholes sulfatados, alquil aril sulfonatos, éteres de polietenóxidos, compuestos de amonio cuaternario) es una práctica habitual en la industria alimentaria (Walker y LaGrange, 1983; Troller, 1993), para disminuir la tensión superficial del agua o de la solución de limpieza, lo que aumenta su capacidad para contactar con todas las superficies y penetrar en la suciedad acumulada. Estos agentes tienen además propiedades emulsionantes y dispersantes. Por ello, los tensioactivos se emplean a concentraciones bajas para evitar la formación de espumas durante la limpieza, que son indeseables en los tratamientos de depuración, particularmente en los biológicos. A pesar de que estos compuestos son en principio degradables por los organismos implicados en la depuración, bajo determinadas condiciones pueden transformarlos en metabolitos estables tóxicos para otros organismos acuáticos (IDF, 1994).

Por otra parte, la descarga de desinfectantes (derivados clorados, iodóforos o amonios cuaternarios), entre los que destacan por su utilización en esta industria los derivados clorados (Walker y LaGrange, 1983, Troller, 1993), también puede provocar inhibición de parte de la flora que actúa en los tratamientos de depuración posteriores. Aunque generalmente sólo llegan en cantidades traza, ya que reaccionan en bastante proporción con la materia orgánica (IDF, 1994). El uso de vapor de agua, otro agente desinfectante comúnmente empleado, puede incrementar la temperatura final de las aguas residuales.

Las deyecciones líquidas y sólidas del ganado (purines) constituyen el principal tipo de residuos del sector ganadero. Su utilización como fertilizantes es práctica habitual, pero en sistemas de cría intensiva, la producción de purines que se concentra en ciertas zonas

puede provocar una seria contaminación de las aguas, la atmósfera y los suelos. Los purines tienen un alto contenido en compuestos nitrogenados (mayoritariamente con amonio) fácilmente oxidables a nitratos que, una vez en el suelo, pueden ser lixiviados y contaminar aguas subterráneas o superficiales, o evaporarse a la atmósfera. (APXA, 1997).

Por lo que se refiere a emisiones a la atmósfera, y concretamente por olores desagradables, algunas actividades agroalimentarias pueden tener un no desdeñable impacto ambiental (Niranjan y Shilton, 1994). La Ley 38/1972 considera a las empresas cerveceras, malterías, azucareras, fábricas de harinas de origen animal o vegetal, industrias del aceite, conserveras de pescado, mataderos, y otras, como potenciales emisoras de contaminación atmosférica.

El sector alimentario, a diferencia de industrias como la química, la petrolera, la minera, etc., no produce cantidades importantes de contaminantes reconocidos como sustancias tóxicas o peligrosas, cuya emisión a la atmósfera o vertido requiere un control mucho más riguroso (RD 952/1997). Comparativamente, los efluentes de industrias químicas tienen un bajo contenido en materia orgánica biodegradable y son frecuentemente ricos en metales pesados que pueden inhibir a la flora responsable de las depuraciones biológicas. Hay sin embargo industrias, como las tanerías y las papeleras, cuyos efluentes se asemejan relativamente a los de las alimentarias en cuanto a su riqueza en materia orgánica. La cantidad de agua utilizada para obtener una unidad de producto en el sector alimentario viene a ser unas 2 veces superior a la necesaria como promedio en la industria química y 5 veces mayor a la usada en la industria textil o papelera (Wheatley, 1994). Las tanerías tienen aguas residuales con cargas elevadas de materia orgánica (proteínas y grasas principalmente), sales, diversas sustancias químicas derivadas de los procesos de curtido y metales pesados como el Cr, Pb, Zn o Cu, además de generar cantidades importantes de residuos sólidos procedentes del recortado, descarnado o depilado, que por su composición son fácilmente deteriorables por microorganismos o insectos (Ockerman y Hansen, 1994).

1. 3. Pautas para la caracterización de residuos y medida de la contaminación que producen

Todo residuo o vertido debe ser caracterizado antes de decidir su posterior tratamiento o destino. Así, debe conocerse el volumen de residuos generados, su composición y propiedades, su naturaleza inocua o tóxica y su transformación previsible en el lugar de depósito o valoración. Estos datos forman parte del Análisis del Ciclo de Vida de un producto, una forma nueva y crecientemente utilizada para valorar el conjunto de costes ambientales necesarios para la fabricación y comercialización de un producto. Se incluyen en este análisis todos los recursos materiales y energéticos empleados, desde los requeridos para la obtención de su materia prima, a los que comporte la eliminación de sus residuos. La tendencia en este sentido es que sean los productores los que carguen con la responsabilidad de la gestión de los residuos, o que compensen económicamente a la administración pública por desempeñar en su lugar esa función (Fullana y Puig, 1997).

La caracterización de residuos sólidos, a parte de realizarse como ya se ha indicado para residuos en general, habrá de regirse en los próximos años según lo que se regula para cada una de las 16 categorías previstas en la Ley 10/1998 de Residuos y lo referente a envases, en la mucho más detallada Ley 11/1997 de Envases y Residuos de Envases y su correspondiente Reglamento.

La contaminación atmosférica se calcula analizando los niveles de emisión (las sustancias que se vierten a la atmósfera), así como el nivel de inmisión atmosférico, esto es, la respuesta de la atmósfera para cada tipo de contaminante al actuar como depósito y filtro. Los contaminantes atmosféricos se presentan en forma de gases o de partículas; entre los primeros se incluyen SO_2 , CO_2 , NO_2 , hidrocarburos, derivados del azufre, del nitrógeno, compuestos halogenados, etc. En forma de partículas se emiten los polvos (partículas sedimentables y en suspensión), humos y aerosoles. También las mezclas de compuestos volátiles que dan lugar a olores molestos, se consideran contaminantes atmosféricos. Las técnicas para el análisis de estos contaminantes están desarrolladas en una Orden de 10 de agosto de 1976.

De igual modo, los efluentes o aguas residuales deben caracterizarse adecuadamente antes de su tratamiento o vertido. A continuación se describen los principales parámetros para llevar a cabo dicha caracterización. Algunos de ellos se utilizan también de forma rutinaria en el control del funcionamiento de las plantas depuradoras.

El **volumen** y el **flujo** con el que se descarga el efluente y las horas del día de máxima descarga son esenciales para diseñar una planta de tratamiento. Es necesario además, conocer los métodos de limpieza empleados, las operaciones implicadas en el proceso, el volumen de los depósitos previos, la velocidad de flujo de las conducciones de descarga y el tiempo que se utilizan, entre otros (Paterson y Cooke, 1998).

El control de la **temperatura** y del **pH**, mediante sistemas discontinuos o continuos, resulta de extraordinaria importancia, ya que estos parámetros determinan en gran medida el tipo de tratamiento aplicable a un efluente (Tong, 1995).

El estado en que se encuentren los contaminantes en los efluentes (disueltos, en suspensión grosera o coloidal) es de gran importancia, dado que la mayoría de los tratamientos de depuración son específicos en este sentido (Henze, 1997). Conviene tener en cuenta que en las aguas ricas en sólidos en suspensión, la penetración de la luz es menor (factor limitante del crecimiento de microorganismos autótrofos) y aumentan los fangos del fondo (hábitat natural de organismos bentónicos) (Wheatley, 1994). Se definen como **Sólidos Totales (ST)** aquellos que quedan tras evaporar el agua de la muestra a temperaturas comprendidas entre 103 y 110°C (Droste, 1997). Estos sólidos pueden encontrarse en el agua disueltos o en suspensión. Para determinar la proporción de ambos, se hace pasar la muestra por un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm, de forma que los sólidos retenidos corresponden a los **Sólidos en Suspensión (SS)**. El contenido en **Sólidos Disueltos (SD)** se obtiene evaporando el agua del filtrado anterior. Un aspecto interesante de los SS es su capacidad de sedimentación; ésta suele determinarse midiendo la cantidad de sólidos que han sedimentado tras dejar la muestra en reposo en un recipiente cilíndrico durante 30-60 min. (Droste, 1997). A veces resulta interesante conocer la cantidad de **Sólidos Totales Volátiles (STV)** o **Sólidos en Suspensión Volátiles (SSV)**; para ello se somete a la fracción correspondiente a un tratamiento térmico a 550-600°C (Tong, 1995; Droste, 1997).

Las aguas residuales contienen normalmente miles de compuestos orgánicos diferentes, por lo que no es posible realizar el análisis individual de cada uno de ellos. Se recurre pues al empleo de métodos que determinan grupos de compuestos o más frecuentemente, la globalidad de los componentes orgánicos allí presentes. Los métodos globales son básicamente de 2 tipos, los que determinan la cantidad de oxígeno consumido al oxidarse la materia orgánica (DBO, DQO, DTO y DTeO) y los que cuantifican la cantidad de CO₂ así producido (COT) (Ronzano y Dapena, 1995).

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO): También denominada Demanda Biológica de Oxígeno (BOD en inglés), es un indicador que se viene utilizando desde hace unos 50 años y representa el contenido en materia orgánica biodegradable. Se define como la “cantidad de oxígeno en mg/L (ppm) consumida en condiciones de ensayo (incubación a 20°C y oscuridad) durante el tiempo necesario para asegurar la oxidación de las materias biodegradables presentes en el agua, por vía biológica”. La DBO es el indicador de contaminación orgánica más empleado para aguas residuales y refleja solamente la materia orgánica “eliminable”, o mejor dicho digerible, por los microorganismos presentes y en presencia de los inhibidores de éstos que puedan coexistir en la muestra.

Tanto las aguas residuales procedentes de la elaboración de alimentos como las domésticas pueden tener un alto contenido en materia orgánica, por lo que, es necesario diluirlas correctamente antes de proceder a su análisis, ya que de lo contrario el oxígeno disponible podría agotarse antes de completarse el periodo de incubación y la metabolización de la materia orgánica. Generalmente las muestras se diluyen con agua destilada que contiene agentes tamponantes, nutrientes y trazas de metales, y se airean para que el oxígeno disuelto se encuentre a saturación. Por otro lado, cuando las muestras mismas poseen una tasa elevada de microorganismos no es necesario proceder a su inoculación; en caso contrario, se pueden inocular con cultivos bacterianos ya aclimatados, generalmente mixtos y disponibles comercialmente (Metcalf y Eddy, 1998).

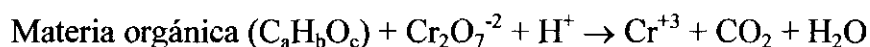
Con el sistema clásico de DBO, se calcula por diferencia el oxígeno consumido, tras determinar el oxígeno disuelto que queda en la muestra. Sin embargo, la DBO puede medirse también de forma continua cuando se dispone de un equipo de tipo “Warburg”.

Este equipo consta de un recipiente que contiene la muestra y en cuyo interior se aloja un segundo contenedor en el que se encuentra una solución de KOH, capaz de absorber el CO₂ generado durante la incubación. Gracias a un manómetro adaptado al recipiente de la muestra, es posible detectar los cambios de presión debidos exclusivamente al consumo de oxígeno. Los respirómetros comerciales son similares al equipo descrito, pero en ellos la presión de oxígeno ejercida sobre la muestra se mantiene constante mediante un sistema electrolítico acoplado; de esta forma, el oxígeno consumido es repuesto inmediatamente por el generado en una reacción de electrólisis. El valor de DBO se calcula entonces conociendo el tiempo y la cantidad de oxígeno producido por electrólisis. Cuando se emplean los equipos anteriores es importante mantener las mezclas en agitación para asegurar la rápida disolución del oxígeno en la fase líquida.

Aunque la oxidación completa es un proceso lento que requiere un tiempo de 21-28 días, la determinación de O₂ consumido suele realizarse por un procedimiento normalizado tras un periodo de 5 días (DBO₅) o 7 (DBO₇). Mientras que en 20 días se realiza la oxidación del 95-99% de la materia carbonosa, en 5 días se llega a oxidar entre el 60 y el 70%. Se considera pues que 5 días son suficientes para conocer de manera aproximada la capacidad de biodegradabilidad de un agua residual. En esta oxidación se distinguen dos etapas: en la primera se oxidan los productos carbonados, mientras que en la segunda se metabolizan los nitrogenados. Se conoce como Demanda Bioquímica de Oxígeno Nitrogenada (DBON) la demanda de oxígeno asociada al proceso de oxidación del material nitrogenado, que suele iniciarse tras un periodo de incubación de entre 6 y 10 días. Así pues, en principio la DBON no se incluye en la DBO₅ siempre y cuando el número inicial de bacterias nitrificantes presentes en la muestra sea suficientemente bajo. Sin embargo, se ha constatado que a menudo la actividad de este tipo de bacterias es lo suficientemente alta como para interferir en el resultado de la DBO. Por ello, la tendencia actual es a sustituir la DBO por la denominada DBOC (Demanda Bioquímica de Oxígeno Carbonosa), en cuyo procedimiento se incluye el pretratamiento de las muestras con agentes inhibidores de las bacterias nitrificantes, como azul de metileno, tiourea, aliltiourea, etc. (Droste, 1997).

Las razones por las que en la actualidad la DBO se utiliza cada vez con menos frecuencia son el prolongado tiempo de incubación, la necesidad de diluir algunas muestras de forma considerable y la posibilidad de que las muestras contengan sustancias inhibitorias procedentes de la propia microbiota.

Demanda Química de Oxígeno (DQO): Consiste en la estimación del contenido orgánico de las aguas por la determinación del O_2 consumido en su reacción con agentes químicos fuertemente oxidantes, en caliente y medio ácido (Rodier, 1981; Ramalho, 1991; Metcalf y Eddy, 1998; Ronzano y Dapena, 1995). Actualmente se emplea el método normalizado del dicromato potásico, que junto con la muestra y en presencia de ácido sulfúrico, se mantiene durante 2 horas a altas temperaturas y reflujo para llevar a cabo la oxidación de los materiales presentes, biodegradables o no (Ramalho, 1991; APHA-AWWA-WEF, 1992; AOAC, 1995; Metcalf y Eddy, 1998). También se incluye en la mezcla de reacción sulfato de plata, como catalizador de la oxidación de determinados compuestos orgánicos (ácidos y alcoholes de cadena larga), y sulfato de mercurio, para evitar la formación de iones crómicos a partir de los cloruros presentes en la muestra.



Tras la oxidación se realiza una valoración colorimétrica con sulfato amónico ferroso, para determinar el dicromato potásico no reducido residual, utilizando ferroína como indicador de punto final.

El dicromato potásico sustituye actualmente al antiguamente empleado permanganato potásico, por su mayor capacidad oxidante, versatilidad y facilidad de manipulación (APHA-AWWA-WEF, 1992; Ronzano y Dapena, 1995). Existen varios *métodos rápidos de determinación de la DQO* que estiman este parámetro en solo 15-20 min y que utilizan los mismos reactivos que el método de referencia. Sin embargo, estos métodos sólo permiten la determinación de alrededor del 65% del valor obtenido con el método normalizado, en el caso de aguas residuales (Ramalho, 1991), y del 60-70%, en el caso de sueros lácteos (Gilliland, 1979). La determinación de la DQO es una técnica

relativamente sencilla que se puede automatizar (Ronzano y Dapena, 1995). Desde hace poco tiempo se encuentra en el mercado un kit para el análisis de la DQO (para un intervalo de 0 a 20.000 ppm de O₂) en muestras lácteas, comercializado con la marca Tubetest[®] por la empresa Palintest (Anónimo, 1998c).

La DQO de un efluente suele ser superior a su DBO, ya que se oxidan más compuestos por la vía química que por la biológica. La DQO mide de forma conjunta y no diferenciada, además de la materia biodegradable, la materia orgánica no biodegradable e incluso la materia inorgánica oxidable (NO₂⁻, S₂⁻, S₂O₃²⁻, Fe²⁺, SO₃²⁻) que pueden encontrarse en proporciones distintas en cada muestra (Rodier, 1981; APHA-AWWA-WEF, 1992; Droste, 1997; Henze, 1997). Por ello, sólo tratándose de muestras cualitativamente análogas es permisible establecer correlaciones entre la DQO y la DBO para estimar con mayor rapidez el contenido orgánico biodegradable y la aptitud en cuanto a biodegradabilidad de un efluente. Así, si el coeficiente de la relación DQO/DBO₅ es superior a 2 la biodegradabilidad del efluente puede verse comprometida, mientras que valores inferiores a 2 indican que las aguas son fácilmente biodegradables (Madrid, 1999).

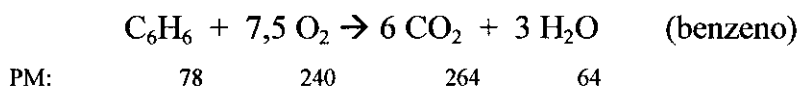
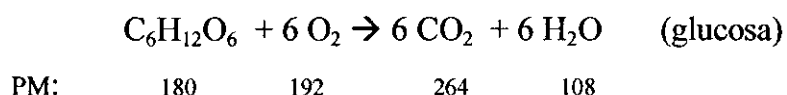
Uno de los principales inconvenientes de la DQO es que algunos compuestos como NH₃, NH₄⁺, bencenos, piridinas y glicoles son resistentes a este tipo de oxidación (Droste, 1997; Henze, 1997). Además, las muestras ricas en cloruros pueden dar valores aparentes de DQO superiores a los reales (Ronzano y Dapena, 1995; Droste, 1997). Tampoco hay que menospreciar el efecto contaminante y corrosivo de los reactivos empleados en esta técnica.

Demanda Total de Oxígeno (DTO): Hace uso de la oxidación con O₂ de los compuestos de carbono, nitrógeno y azufre en un horno a temperatura elevada. Es un método rápido y automatizable. Se obtienen con él valores superiores a los de la DQO ya que se oxida un mayor número de compuestos orgánicos, como el amonio. Este método se encuentra actualmente en vías de desarrollo (Ronzano y Dapena, 1995; Metcalf y Eddy, 1998).

Demanda Teórica de Oxígeno (DTeO): La DTeO permite predecir el poder contaminante de un agua residual siempre que se conozca su composición orgánica y la

concentración de cada uno de sus componentes (Droste, 1997). Para su cálculo se debe establecer el balance de la reacción estequiométrica de cada uno de los componentes orgánicos con el oxígeno para rendir H₂O, CO₂ y/o compuestos inorgánicos oxidados. La DTeO total del agua residual corresponde al sumatorio de las DTeO individuales obtenidas. A continuación se muestra, a modo de ejemplo, el cálculo de la DTeO de una muestra que contiene 150 mg/L de glucosa y 15 mg/L de benceno:

Las ecuaciones para la oxidación total de ambos constituyentes y los correspondientes pesos moleculares son



Para estas ecuaciones la DTeO de la glucosa sería (192/180) = 1,07 mg O₂/mg de glucosa y la DTeO del benceno sería (240/78) = 3,08 mg O₂/mg de benceno. Por lo tanto, la DTeO de la solución es

$$1,07 \times 150 \text{ mg/L} + 3,08 \times 15 \text{ mg/L} = 206,7 \text{ mg O}_2/\text{L}.$$

Los valores de DQO, DBO y DTO representan alrededor de un 80-85%, 50-60% y 90% de los de DTeO, respectivamente.

Carbono Orgánico Total (COT): Los métodos que determinan el COT se basan en la oxidación del carbono de la materia orgánica a CO₂, que se mide con un analizador de infrarrojos no dispersivo. Entre los métodos más utilizados están los de oxidación catalítica en horno a alta temperatura (oxidación por combustión) y los de oxidación húmeda a baja temperatura. En un futuro, es probable que el COT se implante como sistema de control de aguas residuales, ya que permite un análisis rápido (5-10 min), automatizado y continuo de las muestras, siendo además más riguroso que la DQO (Ronzano y Dapena, 1995; Metcalf y Eddy, 1998). Esta tendencia analítica se recoge en la

Directiva 91/271/CEE, donde se explicita que la medida del COT puede sustituir a la de DQO siempre y cuando se establezca previamente la relación entre ambos parámetros para cada tipo de muestra. La principal limitación de este método es que no aporta información sobre el estado de oxidación de la materia orgánica y por tanto sobre la cantidad de oxígeno necesario para llevar a cabo dicha oxidación. Además, en el caso de muestras brutas pueden existir problemas de inyección y requiere reactivos altamente corrosivos, como el ácido sulfúrico o fosfórico.

Otros parámetros que aportan información valiosa sobre la composición de un efluente en relación con su aptitud hacia la depuración son: la **turbidez**, el **color**, el contenido en **nitrógeno total** y en **grasas y aceites**, la **conductividad** y la concentración de **cloruros** y **fosfatos** (abundantes en los efluentes de la industria alimentaria) (Droste, 1997).

2. SUBPRODUCTOS ALIMENTARIOS Y SUS FORMAS DE APROVECHAMIENTO

En España, la industria alimentaria da lugar a aproximadamente el 20% del producto industrial. En 1996 tenía una cifra de producción superior a los 8,2 billones de pesetas, con un total de 40.000 empresas dedicadas a la producción alimentaria y un empleo directo generado de 360.000 trabajadores (Pozo, 1999). Según esta misma fuente, el consumo de materias primas de la industria alimentaria española supera los 4,8 billones de pesetas. Estas materias primas no son en general convertibles al 100% en productos primarios, sino que generan una considerable proporción de residuos. En algunos casos, como el de la industria cárnica, los residuos pueden suponer hasta el 50% del peso de materia prima (Ockerman y Hansen, 1994). Parte de ellos pueden ser considerados como subproductos, aprovechables para la obtención de otros productos alimentarios o no. La valorización de residuos como subproductos y el desarrollo de nuevas formas de aprovechamiento de éstos, cobra cada vez mayor importancia, ya que además de suponer una fuente adicional de ingresos, contribuye a disminuir la contaminación producida por las industrias de primera transformación. La administración pública está promocionando

el desarrollo y difusión de las “mejores tecnologías disponibles” para minimizar residuos industriales, y por otra parte, apoya la organización de “Catálogos de Residuos” y “Juntas de Residuos” para facilitar su aprovechamiento por empresas distintas de las que los generan. A continuación se hace un resumen por sectores de los principales subproductos de la industria alimentaria, y sus posibles formas de aprovechamiento. Se ha excluido de este resumen el llamado “producto no conforme”, que no se puede comercializar. Su aprovechamiento depende del tipo de defecto que presente, que puede no afectar a su idoneidad como alimento (es el caso de unidades o partidas con peso o etiquetado incorrecto).

2. 1. Subproductos de origen vegetal

En 1997, en España se consumieron más de 655.000 Tm de productos de transformación de **frutas y hortalizas** (MAPA, 1998b). Durante el procesado de productos hortofrutícolas para su comercialización en forma enlatada o congelada, se descartan gran cantidad de tejidos vegetales como coronas, hojas, vainas, tallos y peladuras. Estos, en algunos casos, pueden llegar a representar más del 30% de la materia prima inicial; así, por ejemplo, por cada Tm de zanahorias o patatas utilizada por una industria conservera, se generan del orden de 0,37 Tm de residuos sólidos, principalmente peladuras (Paul y Southgate, 1978). El principal destino de los restos vegetales suele ser la alimentación de herbívoros, en forma fresca o desecada previa trituración, o como ensilados (De Rafols, 1964; Mannapperuma, 1996). Existen procedimientos para aislar la proteína de algunas hojas, como las de la patata o la remolacha.

En la elaboración de zumos de frutas, principalmente cítricos, aparte de las peladuras y semillas, se consideran como subproducto las pulpas, que en el caso de la naranja puede llegar a representar más del 55% del peso de la fruta (De Rafols, 1964). Sin embargo, el creciente interés de los consumidores por la ingesta de fibra dietética, ha favorecido la comercialización de zumos con pulpa. A pesar de esta reciente tendencia, el principal destino de la pulpa de cítricos sigue siendo el ganado vacuno en el que su contenido en vitaminas sirve para estimular la producción lechera (De Rafols, 1964;

Mannapperuma, 1996). Las pieles de frutas además de utilizarse en alimentación animal, pueden emplearse como fuente de aceites esenciales y flavonoides, base de esencias y colorantes. La pulpa de manzana, y en menor medida la de cítricos, se emplea para obtener distintos tipos de pectinas, aditivos gelificantes empleados en mermeladas, productos de confitería, postres y refrescos. Las peladuras de peras y de manzanas son particularmente ricas en fibra, siendo una de las fuentes para la obtención de fibra dietética para suplementar productos de bollería y galletería (Mannapperuma, 1996). Otros subproductos del procesado de frutas son las semillas o pepitas, de las que se pueden extraer aceites con aromas muy parecidos a los del aceite de oliva, que se emplean en la fabricación de margarinas y jabones (De Rafols, 1964). Los huesos de frutos carnosos pueden servir además como combustible de calefacción (De Rafols, 1964).

Algunos restos procedentes del procesado de frutas y hortalizas se pueden emplear como sustratos para la fermentación alcohólica, y tras destilación rinden licores aprovechables en la elaboración de bebidas como la ginebra o el vodka (De Rafols, 1964; Varnam y Sutherland, 1997).

De la **industria de los cereales**, los subproductos más relevantes son el salvado, los restos de paja y los zuros del maíz; consumidos habitualmente por los animales, especialmente los rumiantes (McDonald y col., 1981; Hoseney, 1994). Al igual que en el caso de las pulpas, la tendencia a la incorporación del salvado a las harinas para la elaboración de productos de panadería y bollería integral, ha mejorado notablemente el aprovechamiento de este subproducto (Hoseney, 1994). El germen de trigo se comercializa crecientemente para su mezcla con cereales de desayuno. Tanto del germen de trigo como del de arroz o maíz se pueden obtener aceites muy insaturados y ricos en vitamina E, que se incluyen en margarinas o se venden como suplementos dietéticos (Hoseney, 1994). Por su elevado contenido lignocelulósico, los subproductos de los cereales se pueden también utilizar en la industria papelera. Otras aplicaciones son como texturizantes de suelos agrícolas, para la construcción de paneles aislantes, y para la obtención de alquitrán (De Rafols, 1964).

Los bagazos de caña de azúcar, la pulpa de remolacha y las melazas son los subproductos típicos de la **industria azucarera**. Los bagazos de caña de azúcar se han

empleado tradicionalmente como material de combustión; también pueden usarse para la fabricación de papel y cartón, y en alimentación de rumiantes, como la pulpa de remolacha (De Rafols, 1964; Pennington y Baker, 1989). Además, son una materia prima óptima para la fabricación de paneles aislantes y materiales poliméricos, ya que contienen ácido aconítico, cuyos ésteres participan en la formación de acetatos de cloruro de polivinilo (De Rafols, 1964). Las melazas contienen alrededor de un 30% de sacarosa y un contenido importante de inositol; se emplean en alimentación humana y animal. El destino más tradicional de las melazas es la elaboración de diversas bebidas alcohólicas, entre las que destaca el ron, pero también se han aprovechado (sobre todo en Brasil) para obtener etanol para uso como combustible (De Rafols, 1964; Varnam y Sutherland, 1997). La vinaza o subproducto de la destilación, se puede emplear (dentro de ciertos límites) como fertilizante.

Los residuos tradicionales de la **industria aceitera** son los orujos y alpechines. Los primeros contienen todavía cantidades significativas de aceite, que puede extraerse con disolventes como el hexano, para la obtención de aceites de orujo destinados al consumo humano (Kiritsakis, 1992). Una vez agotados, estos orujos se usan fundamentalmente como combustible en la propia almazara o como fertilizante, aunque también se pueden utilizar los restos de huesos para la fabricación de determinados plásticos (Kiritsakis, 1992). Aunque los alpechines suelen considerarse como residuos (Civantos y col, 1992), se han realizado esfuerzos tecnológicos para su aprovechamiento, como por ejemplo la obtención de proteína unicelular para alimentación animal tras el cultivo de levaduras (Kiritsakis, 1992). En los últimos años, los cambios en la tecnología de los procesos de extracción del aceite, han conducido a la obtención de un nuevo tipo de subproducto, el alperujo o alpeorujo (alpechín más orujo), que además de emplearse en la obtención de aceites para consumo humano, pueden usarse como combustible (Martínez Nieto y col., 1998).

En cuanto a los subproductos de la extracción de aceites de semillas oleaginosas, cascarillas y torta de prensado, la principal aplicación es la fabricación de piensos para animales (Anónimo, 1988). Muchos de estos subproductos, sin embargo, pueden procesarse de forma análoga a la torta de soja, para obtener, una vez separados gran parte

de los carbohidratos y de los compuestos de acción anti-nutritiva que pueda haber presentes, preparados ricos en proteína utilizables en formulación de alimentos para consumo humano.

El vino y la cerveza son las principales **bebidas alcohólicas** elaboradas en nuestro país. En las bodegas de vino, los subproductos más importantes son los orujos, de los que se derivan productos secundarios como aguardientes, alcohol de quemar y otros alcoholes de combustión, además de tartrato potásico y aceites (De Rafols, 1964; Vogt, 1984). Los aguardientes de orujo pueden llegar a poseer características organolépticas muy apreciadas, como ocurre con algunos de origen gallego, francés (*marc*) o italiano (*grappa*) (Vogt, 1984). Aunque el ácido tartárico se puede obtener por síntesis química, resulta más económico hacerlo, por precipitación y posterior disociación, a partir del tartrato potásico contenido en los restos de destilación (Vogt, 1984). Por otra parte, el aceite de pepita de uva posee un sabor agradable y puede llegar a representar un 20% del peso seco de la semilla, por lo que, convenientemente refinado, se emplea con fines alimentarios; cuando su calidad es baja, sin embargo, se suele destinar a la fabricación de pinturas al óleo y jabones (De Rafols, 1964; Vogt, 1984). En ocasiones, los orujos se utilizan como abonos para viñedos u otros cultivos, ya que su contenido en nitrógeno, fósforo y potasio es similar al del estiércol (Vogt, 1984). Las heces del vino constituyen otro subproducto típico de las bodegas, que puede emplearse para la obtención de aguardientes por ser rico en éter enántico (esencia de brandy), de aceites de vino, o como abono agrícola (Vogt, 1984).

En la elaboración de cerveza se obtienen alrededor de 60 unidades de bagazo húmedo por cada 100 unidades de malta procesada (Hough, 1990). Aunque este subproducto suele emplearse en alimentación animal, fresco o desecado, a veces, se utiliza como medio de filtración para retener partículas y reducir el contenido en nitrógeno de los efluentes, disminuyendo así los costos del tratamiento de depuración (Hough, 1990). Otra vía de aprovechamiento del bagazo es la obtención de hexosas y pentosas, mediante hidrólisis de los carbohidratos residuales, para usarlos como sustrato para el cultivo industrial de levaduras. La levadura de cervecería es muy rica en proteínas, vitaminas del grupo B y es fácilmente digerible, por lo que se emplea como fuente de estos nutrientes en

alimentación animal (McDonald y col., 1981). También puede destinarse a la obtención de extractos saborizantes y aromatizantes de alimentos de consumo humano, o para la elaboración de suplementos dietéticos (Hough, 1990). Al ser este tipo de levadura rica en invertasa, a menudo se destinan preparaciones deshidratadas a la obtención de azúcar invertido, por ejemplo, para la fabricación de bombones rellenos (Hough, 1990).

2.2. Subproductos de origen animal

En la **industria cárnica** la naturaleza de los subproductos varía mucho según el país. Así, en EEUU se considera subproducto cualquier parte de un animal que no sea la canal limpia (Ockerman y Hansen, 1994). Sin embargo, en otros países como España, existe tradición de consumo de algunos despojos como hígado, riñones y lengua, que no se consideran subproductos. El empleo de vísceras para consumo humano se ha reducido mucho en los últimos años debido a los frecuentes casos de contenidos excesivos de diversos medicamentos y contaminantes ambientales. Hay además otras razones para el descenso en el consumo de estos productos: la alta velocidad de deterioro (caso por ejemplo del hígado y diversas glándulas por su alto contenido en enzimas), el contenido alto de colesterol (caso de los sesos), o de grasas saturadas de los guisos en que se incluyen (caso de los callos). Muchas de estas vísceras se utilizan actualmente en enlatados de comida para gatos y perros. En la alimentación de animales de abasto, la tendencia, sin embargo, es hacia la reducción en el empleo de materias primas de origen animal, debido al coste de los altos tratamientos térmicos requeridos para destruir posibles agentes infecciosos. El caso de la encefalopatía espongiforme bovina (popularmente llamado “de las vacas locas”) ha impuesto un importante cambio en este sentido. La elaboración de productos farmacéuticos y cosméticos a partir de subproductos de matadero, sólo se realiza en países o zonas donde se ofrecen exhaustivas garantías de ausencia de agentes infecciosos.

Diversas técnicas permiten actualmente el aprovechamiento de porciones cárnicas que hasta hace poco tiempo se descartaban con los huesos, por estar asociadas a regiones anatómicas de difícil acceso, como columna vertebral, costillar, pescuezo y esternón. Este

tipo de carne, conocida como carne recuperada mecánicamente, puede llegar a rendir 6,5 kg por cabeza de vacuno y es muy apreciada, por sus propiedades funcionales, como ingrediente para la elaboración de numerosos productos cárnicos (Ockerman y Hansen, 1994).

Entre los subproductos típicos de la industria cárnica destacan las pieles y los huesos, que pueden llegar a suponer entre el 12-19% del peso del animal vivo (Ockerman y Hansen, 1994). Aunque de las pieles se pueden obtener productos tan diversos como felpudos, brochas, productos cosméticos a base de colágeno, etc., sus principales clientes son la industria del cuero y calzado. Los huesos, tras su tratamiento térmico, se emplean frecuentemente, solos o junto con restos de carne, para la obtención de harinas para el ganado. Una característica de los huesos y de las pieles es su alto contenido en colágeno, por lo que se emplean a menudo para la producción de colas y gelatinas. Las gelatinas se emplean por sus propiedades gelificantes, espumantes, emulsificantes y de textura en la elaboración de caramelos blandos, cerveza, quesos, y como agentes de recubrimiento en derivados cárnicos. La gelatina (colágeno desnaturalizado) se caracteriza por la falta absoluta de triptófano, por lo que necesita combinarse en la ingesta con casi cualquier otra proteína, para ser aprovechada como fuente de aminoácidos esenciales. Las colas, por sus propiedades adhesivas, suelen destinarse a industrias de carpintería, cartonaje y papelería.

A partir de tejidos adiposos de difícil venta directa, como la grasa de papada, perirrenal, o la asociada a huesos y despojos, se pueden obtener por fusión diversos productos grasos de interés comercial. Dentro de los sebos y mantecas, algunos se emplean para consumo humano, en repostería o cocina, y se incluyen en formulaciones de piensos. Es posible también destinar determinadas grasas o aceites a la fabricación de velas, detergentes, cosméticos, pinturas, recubrimientos, lubricantes y jabones (Ockerman y Hansen, 1994).

La sangre es una excelente fuente de proteínas con una composición aminoacídica muy equilibrada, y representa entre el 2,4 y el 8% del peso vivo del animal (Ockerman y Hansen, 1994). Realizando un faenado adecuado es posible conseguir del vacuno una cantidad de sangre equivalente a 0,5 kg de proteína por animal (Ockerman y Hansen, 1994). Por ello, su principal destino es la alimentación humana y animal, bien en forma

fresca, congelada o desecada. El fraccionamiento de la sangre no coagulada e higiénicamente extraída para obtener plasma deshidratado (mayoritariamente albúmina), un excelente gelificante y espumante, es práctica relativamente común en la industria alimentaria. La obtención de otras fracciones proteicas de la sangre para uso alimentario es aún poco habitual, pero se hará previsiblemente más frecuente en los próximos años. Desde el punto de vista nutricional, las proteínas del plasma tienen un excelente perfil de aminoácidos esenciales, con los azufrados (Met + Cys) como limitantes.

En el aprovechamiento de los subproductos avícolas, además de la obtención de harina de huesos y carne recuperada mecánicamente, hay que señalar también el empleo de plumas para la fabricación de ropa de cama, equipos deportivos, aislamientos y fertilizantes. Sin embargo, la producción de harina de plumas es el proceso actualmente de mayor importancia. Las plumas se caracterizan por un alto contenido en queratina, una proteína de bastante baja digestibilidad, por lo que la calidad nutritiva de las correspondientes harinas depende de la presión y el tiempo aplicados durante su tratamiento térmico. La queratina es rica en aminoácidos azufrados, por lo que, una vez hecha más digerible, puede compensar el perfil de aminoácidos esenciales (y así mejorar el valor nutritivo) de, por ejemplo, la proteína de plasma, soja o de organismos unicelulares. Las cáscaras de huevo representan aproximadamente el 11% del peso total del huevo y son una fuente excelente de carbonato cálcico (94%), por lo que se suelen destinar a la fabricación de harinas usadas como suplemento dietético para aves.

Tradicionalmente, muchos de los subproductos de la **industria de transformación de productos de la pesca**, como cabezas, esqueletos, colas, aletas, vísceras y otros residuos del procesado, junto con la morralla o pesca incidental (especies de peces y moluscos no comercializadas habitualmente) se han destinado a la fabricación de harinas colas y aceites de pescado. A pesar de que su incorporación en las formulaciones de piensos animales se realiza sólo dentro de ciertos límites, porque pueden llegar a conferir olor y sabor a pescado a la carne de los animales consumidores, las harinas son una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas del grupo B y minerales, y los aceites de vitaminas A y D. Estos últimos se pueden refinar para su empleo en consumo humano,

como aceites de enlatado, o fritura, y para la producción de margarinas. Otras aplicaciones minoritarias de estos aceites son la obtención de jabones, barnices, tintas de imprenta, etc.

Los restos de músculo resultantes del fileteado de algunas especies de pescado se pueden emplear para la obtención de “*marinbeef*” o carne marina, un concentrado proteico sin olor ni sabor a pescado que se texturiza por extrusión y se puede emplear como sucedáneo o extensor de productos cárnicos.

Otro ejemplo de aprovechamiento de subproductos de la pesca, es la obtención de quitina, un polisacárido aminado, y de su derivado quitosano, a partir de caparazones de crustáceos (eliminando proteína y minerales), para su uso como material adhesivo, material adsorbente de iones metálicos y proteínas y agente de revestimiento, en diversas industrias (Knorr, 1984). También cabe mencionar la obtención de cuanina, compuesto iridiscente que se encuentra en la epidermis y escamas de las especies de pescado que habitan a poca profundidad (arenque, bonito), muy apreciada en la fabricación de objetos tales como perlas sintéticas (Ockerman y Hansen, 1994).

Sin ninguna duda, el principal subproducto de la **industria láctea** es el suero de quesería, que será tratado extensamente en el siguiente apartado de este capítulo.

Otro subproducto característico de esta industria es la mazada o suero de mantequería, que se obtiene en la elaboración de mantequilla a partir de nata concentrada. La mazada tiene un 3,5- 4,5 % de lactosa, un 3- 3,5 % de proteínas y un 0,1- 0,7 % de grasa (Walstra y Jenness, 1987). La obtenida por procedimientos discontinuos puede ser más pobre en grasa, ya que el tiempo de operación es flexible, en función del rendimiento (Spreer, 1991). Hay dos tipos de mazada, la procedente de la elaboración de mantequilla ácida y la dulce. En general, la ácida se comercializa como leche fermentada, como materia prima para la obtención de cuajada de mazada, o como suplemento dietético para el ganado. La mazada dulce, por su riqueza en fosfolípidos, suele destinarse a la producción de leches fermentadas, donde además de utilizarse para ajustar el extracto seco, actúa como emulsionante (Spreer, 1991). La mazada puede también emplearse para obtener caseínas, utilizables en la fabricación de plásticos, papel, colas, pinturas, fibras artificiales y cerdas para cepillos (De Rafols, 1964).

Subproductos lácteos minoritarios son las salmueras y los aceites empleados en la fabricación de algunos quesos, que tras filtración, pueden reutilizarse varias veces. La obtención de jabones es una de las salidas tradicionales de los aceites gastados.

2. 3. El suero de quesería como subproducto

2. 3. 1. Producción de suero a nivel mundial, europeo y español

Los últimos datos disponibles sobre la producción mundial de leche corresponden a 1997 y la cifran en 545 millones de Tm (FAO, 1998). El 35% de esta producción corresponde a la Unión Europea (190 millones de Tm) (FAO, 1998). Se prevé que hasta el año 2001 la producción mundial aumente en un 1% anual. Sin embargo, en los países de la UE la tendencia será inversa, con un descenso estimado del 1,5% debido a las cuotas lecheras impuestas a estos países (Mann, 1998a). En 1997 la producción española de leche fue entre 6,4 y 6,6 millones de Tm, siendo el 6º país productor de la UE detrás de Alemania, Francia, Reino Unido, Holanda e Italia (MAPA, 1997; FAO, 1998). Del total de la leche producida en nuestro país, el 91% corresponde a leche de vaca, y el resto a leche de oveja y cabra en igual proporción (MAPA, 1997). Se ha estimado que aproximadamente la mitad de la leche de vaca obtenida en España en 1997, se destinó a la producción de leches de consumo líquidas (MAPA, 1998a).

La producción mundial de queso se ha incrementado en más de un 8% de 1986 a 1996, y se cree que seguirá aumentando ligeramente, pasando de los 15,6 millones de Tm de 1995 a unos 16 millones de Tm en el año 2001 (FAO, 1996; Mann, 1998a). Del total de queso elaborado en el mundo, la UE y EEUU producen el 67% (Mann, 1998a). A nivel mundial, la producción que más ha crecido es la del queso fresco, un 33% en 10 años, debido principalmente al aumento en la demanda de alimentos preparados y a la gran explosión del consumo de pizzas (Mann, 1998a). Además, muchos países orientales de escasa tradición quesera, están occidentalizando sus hábitos dietéticos y comenzando a consumir queso.

En España existen 504 queserías, lo que representa el 48% del total de las industrias del sector lácteo. De ellas tan solo 28 tienen una producción superior a 2.500 Tm/año (MMA, 1996). La cantidad total de queso producido en nuestro país en 1995 ha sido estimada por la FAO (1996) en 172.000 Tm y por la FENIL en 269.000 Tm (Anónimo, 1998a). Según esta última fuente, la producción en 1996 fue similar a la del año anterior, correspondiendo el 50% a queso de mezcla, el 25% a queso de vaca, el 14% a quesos fundidos y el resto a quesos de oveja y cabra (Anónimo, 1998a). Aunque en España se comercializan más de 100 variedades de queso, destaca por su volumen de producción, después del queso de mezcla, el de vaca fresco, que en 1996 alcanzó las 45-47.000 Tm (Anónimo, 1997). A pesar de que los quesos con Denominación de Origen son muy apreciados en nuestro país, su producción fue tan sólo de 8,2 Tm en 1996, correspondiendo el 50% de esta cifra a queso Manchego (Anónimo, 1997). En general, se puede decir que la producción quesera española se mantiene más o menos constante, ya que el aumento en la producción de quesos frescos ha sido compensado por un descenso en la elaboración de quesos de mezcla (P. Valentín Gamazo, comunicación personal).

Los quesos producidos en continuo (una proporción muy pequeña, actualmente) son los únicos que no dan lugar a suero como subproducto. Su proceso de elaboración comienza por la concentración de la leche por ultrafiltración (dando como subproducto un líquido permeado más pobre en material nitrogenado que el obtenible a partir del suero de quesería convencional) y después de la coagulación no se realiza desuerado.

No existen datos publicados sobre la producción mundial de suero de quesería, pero, considerando que por cada Kg de queso se obtienen aproximadamente unos 9 L de suero, podemos estimar esta cifra en unos 140-144 millones de Tm. Los datos disponibles indican que casi la mitad de la producción mundial de suero se obtiene en los países de la UE (Comegna, 1996). En España, se vienen produciendo entre 1,5 y 2,4 millones de Tm de suero (FAO, 1996; FENIL, 1998). Para hacernos una idea gráfica de este volumen, y considerando que una piscina olímpica de 2 m de profundidad, tiene aproximadamente 2.500 Tm de capacidad, se puede calcular que con el suero español se podrían llenar unas 700 piscinas. En 1984, Zall ya se refería a la producción de suero como a un “océano de líquido”.

2. 3. 2. Composición de los principales tipos de suero de quesería

El Código Alimentario Español, define como *suero* “los líquidos formados por parte de los componentes de la leche que resultan de diversos procesos de elaboración de productos lácteos”. Esta definición incluye el suero de quesería, el de mantequilla (mazada) y los procedentes de la obtención de caseínas. El *suero de quesería* es ahí definido como “el líquido residual de la elaboración del queso”.

El *suero de quesería* es un líquido amarillo-verdoso que se obtiene tras la separación de la cuajada. Uno de los principales factores que afectan a la composición de este subproducto es el tipo de coagulación empleado. Así, en función de que la coagulación sea más o menos láctica y/o enzimática se obtienen distintos tipos de cuajadas y sueros. En general, los sueros de quesería se denominan *ácidos* cuando poseen valores de pH igual o inferiores a 5, y *dulces* si su pH es superior a 5,6 (Madrid, 1994; Mawson, 1994). La composición del suero de quesería no sólo depende de las particularidades del proceso de elaboración, sino también de la composición de la leche cruda empleada (Hobman, 1984; Zall, 1992; Madrid, 1994; Castillo y col., 1996). La Tabla 2 muestra una relación de los principales factores que influyen en la composición de este subproducto.

Como se indica en la Tabla 3 el suero de quesería (ácido o dulce), incluye en su composición un 93-94% de agua, 3,3-6% de lactosa, 0,5-0,9% de proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina, principalmente) y 0,1-1% de grasas, además de minerales, ácido láctico y bastante alta concentración de vitaminas del grupo B (Hargrove y col., 1976; Glass y Hedrick, 1977a; Glass y Hedrick, 1977b; Marwaha y Kennedy, 1988; Zall, 1992; Luquet, 1993; Madrid, 1994; Mawson, 1994; Yang y Silva, 1995; Castillo y col., 1996; González Siso, 1996).

La lactosa suele estar presente en sueros dulces o ácidos en similar concentración, aunque, en algunos sueros ácidos, su nivel puede ser algo más bajo como consecuencia de las fermentaciones bacterianas experimentadas durante el proceso de fabricación del queso (Glass y Hedrick, 1977a; Mawson, 1994). El contenido mineral suele ser ligeramente superior en los sueros ácidos (Hargrove y col., 1976; Glass y Hedrick, 1977b; Zall, 1992). En este tipo de sueros puede ser también particularmente alta (hasta 0,7%) la

cantidad de ácido láctico (Mawson, 1994). Ambas variedades de suero suelen presentar un alto contenido salino, constituyendo el NaCl y el KCl más del 50% del total de las sales presentes (Zall, 1992; González Siso, 1996). Los sueros, particularmente los ácidos, contienen bastante fosfato cálcico (Glass y Hedrick, 1977b; González Siso, 1996) y son muy pobres en hierro y yodo (Glass y Hedrick, 1977b; Zall, 1992). En general, los sueros son una excelente fuente de vitaminas del grupo B, especialmente de B₁₂, riboflavina, ácido pantoténico, biotina y colina (Glass y Hedrick, 1977b; Zall, 1992; Madrid, 1994).

Tabla 2. Factores que afectan a la composición química del suero de quesería.

Composición de la leche cruda	Proceso de elaboración empleado
<i>Factores genéticos</i>	<i>Tratamiento previo de la leche</i>
Especie animal	Pasterización
Raza	Filtración
Mejora genética	Refrigeración
Individuo	<i>Modo de obtención de la cuajada</i>
	Cultivos iniciadores
	Empleo de ácidos.
	Tipos de enzimas: origen animal, vegetal o microbiano
<i>Factores ambientales</i>	<i>Manipulación de la cuajada</i>
Edad	Tamaño del corte
Alimentación	Temperatura/tiempo
Número de partos	Agitación
Fase de la lactación	Desuerado

Tomado de Castillo y col. (1996).

Tabla 3. Composición química del suero de quesería y del líquido permeado por ultrafiltración.

Composición (g/100 mL)	SUERO		PERMEADO	
	Dulce	Acido	Dulce	Acido
Humedad	93-94	94-94,6	93,6-94,3	93,1-94,2
Sólidos totales	5,6-6,4	5,6-6,8	5,7-6,4	5,8-5,9
pH	5,6-6,1	4,3-4,7	5,6-6,1	4,3-4,7
<i>Contenido en sólidos</i>				
Lactosa	4,4-5,1	3,7-5	4,9-5,8	4,3-4,55
Proteína	0,5-0,9	0,5-0,8	0,01-0,012	0,018-0,02
Grasa	< 0,05-0,7	0,04-0,06	< 0,01	< 0,01
Ácido láctico	0,1-0,2	0,5-0,7	0,14	0,44-0,62
Minerales	0,5-0,7	0,6-0,8	0,5-0,54	0,56-0,74
<i>Contenido en minerales</i>				
Calcio	0,04-0,05	0,1	0,04-0,05	0,14
Fósforo	0,03-0,05	0,08	0,03	-
Hierro	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001
Sodio	0,04-0,5	0,05	0,04-0,06	0,05
Potasio	0,13-0,16	0,14	0,13-0,18	0,17
<i>Vitaminas ⁽¹⁾</i>				
Vit. A (UI/100 g)	69-240	47-165	-	-
Tiamina (mg/100 g)	0,38-0,59	0,35-0,58	-	-
Riboflavina (mg/100 g)	1,7-2,9	1,5-2,3	-	-
Biotina (µg/100 g)	28-112	29-49	-	-
Niacina(mg/100 g)	0,76-2,03	0,61-2,51	-	-
Pantoténico (mg/100 g)	8,2-15	7-14	-	-
Vit. B ₆ (mg/100 g)	0,3-0,7	0,4-0,9	-	-
Vit. B ₁₂ (µg/100 g)	0,9-3,7	1,7-3,4	-	-
Colina (mg/100 g)	62-173	60-171	-	-

Datos publicados por diversos autores (Hargrove y col., 1976; Glass y Hedrick, 1977a; Glass y Hedrick, 1977b; Hobman, 1984; Pearce, 1992; Zall, 1992; Madrid, 1994; Mawson, 1994; Yang y Silva, 1995)

(1) Contenido estimado en suero en polvo por Glass y Hedrick (1977b).

El componente de los sueros con mayor valor comercial son las proteínas, que constituyen del 0,5 al 0,9% del peso húmedo. La proteína del suero bovino tiene un perfil de aminoácidos esenciales tan bueno como el de la Proteína de Referencia de la FAO (la proteína imaginaria que representa la proporción de aminoácidos ideal para cubrir las necesidades humanas). Por ello se emplea en preparados para lactantes. El nivel de lisina es incluso mayor que el de la Proteína de Referencia, por lo que complementa perfectamente a la proteína de cereales, limitante en este aminoácido.

Cuando se habla genéricamente de la “proteína del suero”, la expresión suele incluir a todo el material nitrogenado. En leche hay algunos péptidos muy característicos, con distintas acciones fisiológicas (por ejemplo, opioide), que se denominan genéricamente “péptidos activos” y que en su mayor parte pasan al suero.

El péptido más abundante y típico de los sueros de quesería es sin embargo el glicomacropéptido, también llamado caseino-macropéptido, de 64 aminoácidos, procedente de la hidrólisis de la κ -caseína durante el cuajado, y que puede llegar a constituir hasta un 0,1% del suero. También se han identificado en suero diferentes fracciones oligopeptídicas de unos 20-25 aminoácidos, procedentes de la hidrólisis de diversas caseínas durante la fabricación del queso (Chianese y col., 1997). Otros compuestos nitrogenados presentes en el suero son las proteosa-peptonas (péptidos de tamaño medio), la urea (200-600 ppm) y el ácido úrico (Horton, 1995; González Siso, 1996). Como se muestra en la Tabla 4, el suero es además rico en aminoácidos libres, particularmente en ácido glutámico, lisina, prolina, tirosina y ácido aspártico (Mavropoulou y Kosikowski, 1973).

Separando las proteínas del suero por ultrafiltración, o bien por precipitación mediante calentamiento o tratamiento con sales, se obtienen, respectivamente, el *permeado* y el *suero desproteinizado* (Zadow, 1984; Zall, 1992). Aunque su contenido en solutos de bajo peso molecular es similar al de los correspondientes sueros, su contenido en grasas y material nitrogenado depende del tamaño del poro de la membrana de filtración o del tratamiento de desproteinización aplicado. Aunque en esta tesis se ha trabajado sobre todo con permeado procedente de la ultrafiltración de suero de quesería dulce, incluimos en la Tabla 3 la composición química descrita por varios autores para

diferentes permeados de ultrafiltración (utilizando membranas con poros de distintos tamaños).

Tabla 4. Aminoácidos libres en suero de quesería.

Aminoácido	Suero ácido (g/Kg suero en polvo)	Suero dulce (g/Kg suero en polvo)
Lisina	0,48-2,02	0,04-0,22
Histidina	0,12-0,28	0,03-0,16
Arginina	0,04-0,21	0,09-0,25
Ácido aspártico	0,25-0,41	0,04-0,43
Serina	0,06-0,08	0,05-0,17
Ácido glutámico	0,95-3,32	0,28-2,50
Prolina	0,49-1,74	0,15-0,83
Glicina	0,03-0,07	0,07-0,38
Alanina	0,06-0,21	0,07-0,52
Valina	0,03-0,16	0,02-0,15
Leucina	0,05-0,17	0,02-0,10
Tirosina	0,21-0,99	0,02-0,20
Fenilalanina	0,09-0,29	0,02-0,28
Cistina	0,01-0,04	0,04

Tomado de Mavropoulou y Kosikowski (1973).

Es difícil generalizar sobre el contenido microbiano (cuali- y cuantitativo) característico de un suero de quesería. Numerosos factores intervienen en su gran variabilidad microbiológica: la composición química y contaminación inicial de la leche, los tratamientos de higienización empleados, y sobre todo el tipo de cultivo iniciador empleado en la elaboración del queso y su temperatura y tiempo de incubación (Hobman, 1984; Villani y col., 1995). Las especies presentes en los cultivos iniciadores son

generalmente bacterias lácticas homo- y/o heterofermentativas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Entre los contaminantes de origen ambiental, además de numerosas bacterias, se han aislado con frecuencia levaduras de las especies *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Yarrowia lipolytica* (Macedo y col., 1995; Viljoen y Greyling, 1995). Es requisito legal para poder comercializarse en nuestro país, que un suero líquido no exceda las 10^5 u.f.c./mL (Código Alimentario Español).

Ya se ha comentado anteriormente que los sueros presentan un considerable contenido en materia orgánica. La DQO de un suero dulce oscila entre 57.000 y 100.000 mg/L (Gilliland, 1979; Gholson y Gough, 1980; Bayer, 1983; Marwaha y Kennedy, 1988; De Felice y Scioli, 1994; Ghaly y El-Taweel, 1995a) y la DBO₅ entre 30.000 y 50.000 mg/L (Marwaha y Kennedy, 1988; Reinbold y Takemoto, 1988; Harden, 1996). Una fábrica que procese 100.000 L de leche/día da lugar a una contaminación equivalente a la generada por una población de 55.000-65.000 habitantes (González Siso, 1996; MMA, 1996). Los 4,6 millones de litros de suero generados diariamente en España, en caso de no ser utilizados o depurados aportarían una carga contaminante equivalente a la de las aguas residuales domésticas generadas por 4,5 millones de personas.

Cuando se recuperan las proteínas por ultrafiltración, precipitación con sales o calentamiento, se obtiene una reducción de entre 10.000 y 15.000 mg/L de la DQO (Mawson, 1994; González Siso, 1996). El vertido de los líquidos resultantes (los permeados), aunque carezcan de proteínas, también pueden constituir un problema medioambiental, porque la lactosa todavía presente, representa el 70-80% de la DQO del suero de partida (Zadow, 1992; Zall, 1992).

2. 3. 3. Principales formas de aprovechamiento del suero de quesería

Es posible que el aprovechamiento (aunque parcial) del suero se remonte a los orígenes de la elaboración del queso. Se sabe que 500 años a.C. los griegos ya prescribían el suero como bebida terapéutica. En la Edad Media, el suero se utilizaba en fórmulas de

“crecepelos” y brebajes contra quemaduras y diversas enfermedades. Es práctica tradicional su empleo para preparar requesón o bebidas para personas o animales.

En las últimas décadas se está prestando en los países más desarrollados especial interés al medio ambiente y, entre otros, al problema de la contaminación por suero de los ríos y arroyos. Esto, sumado a la conciencia del derroche de componentes lácteos de valor biológico y comercial (lactosa y proteínas), ha conducido al desarrollo de muy diversas formas de aprovechamiento.

Se pretende pues, para empezar minimizar, el vertido de suero y líquidos derivados, aunque dicho vertido se realice de forma controlada a las redes de alcantarillado y con destino a las depuradoras urbanas. Sin embargo, esto exige inversiones que no siempre son directamente proporcionables a las cifras de producción. Para elegir la forma de aprovechamiento más adecuada hay que tener en cuenta el tamaño de la industria. Así, por ejemplo, para una quesería que produzca menos de 50.000 L de suero/día, en general, sólo resulta rentable su utilización directa para alimentación animal o como fertilizante natural (Yang y Silva, 1995). Para queserías con producciones de entre 50.000 y 200.000 L de suero/día puede ser rentable instalar un sistema de ultrafiltración para recuperar las proteínas, o fabricar requesón o suero en polvo, o incluso emplear algún tipo de fermentación para la producción de suero amoniaco (FACW –Fermented Ammonium Condensed Whey-) para alimentación animal (Yang y Silva, 1995). La aplicación de procedimientos para la obtención de concentrados proteicos (WPC –Whey Protein Concentrate-), lactosa cristalizada, fermentaciones, jarabes de lactosa hidrolizada, etc., suele estar limitada a queserías que producen más de 200.000 L suero/día (Yang y Silva, 1995). En la Figura 1 se muestran esquemáticamente algunas de las posibilidades de aprovechamiento del suero.

2. 3. 3. 1. Utilización del suero completo

Entre las principales alternativas disponibles para la utilización del suero sin ningún tipo de tratamiento está su adición a *piensos y aguas de bebida de animales*, sobre todo de cerdos (Marwaha y Kennedy, 1988; Morr, 1992; Yang y Silva, 1995; González Siso,

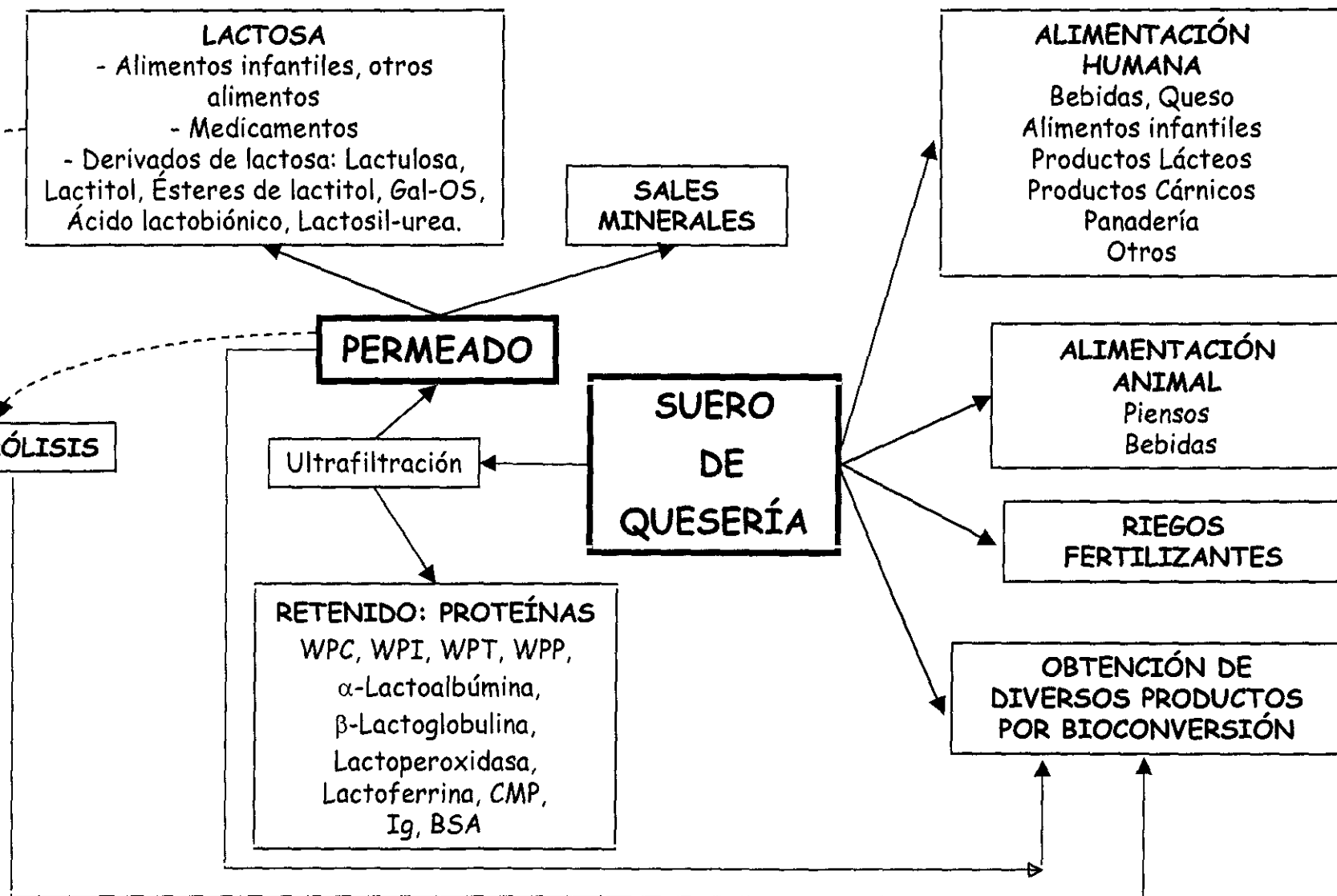


Figura 1. Aprovechamiento del suero de quesería.

1996). El empleo del suero en polvo para alimentación animal ha constituido hasta hace poco una de las aplicaciones más importantes, bien incorporado a piensos o fórmulas para animales lactantes, o bien en forma de bloques para lamer (Hobman, 1984; Morr, 1992; Yang y Silva, 1995). La deshidratación o concentración de los sueros facilita su manejo y abarata su transporte a las granjas, a la vez que preserva las cualidades del suero fresco. Además, aplicando ligeras transformaciones (por mezcla o fermentación) se han logrado aditivos para alimentación animal aceptados por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos, como es el suero amoniacal (o FACW) antes citado, que se destina a la alimentación de rumiantes (Juengst, 1979).

También el hombre es un consumidor tradicional de derivados del suero. Así, en Italia, España y otros países de la cuenca mediterránea es muy frecuente la elaboración (por coagulación térmica a 80-90°C) de los denominados *quesos de suero* (Ricotta, Requesón, Anthotyros) cuya composición contiene mayoritariamente proteínas séricas (Jelen, 1983; Código Alimentario Español, 1992; Pearce, 1992; Jelen, 1992; Kalogridou-Vassiliadou y col., 1994). También en Noruega es habitual el uso del suero para hacer un análogo de queso (Mysost) evaporando por ebullición cerca del 50% del agua.

Aunque el principal destino de los sueros en polvo sea la alimentación animal (González Siso, 1996), en inferior proporción se utilizan también en alimentación humana, como ingredientes alimentarios en la industria láctea (yogures, helados, postres), cárnica (embutidos cocidos), panadera, pastelera y en la fabricación de bebidas (para deportistas, por ejemplo) y alimentos infantiles (Mathur y Shahani, 1979; Marwaha y Kennedy, 1988; Morr, 1992; González Siso, 1996). En estos productos, el suero (a veces empleado como sustituto de la leche) puede contribuir a mejorar las características organolépticas (sabor, textura, color) y a aumentar el valor nutricional. El principal factor limitante para la utilización del suero es el alto contenido en sales, que le confiere un sabor salado/metálico poco atractivo para el consumidor y que es más acusado en los sueros ácidos (Hoppe y Higgins, 1992; Morr, 1992; González Siso, 1996). La desmineralización (por ósmosis inversa, por ejemplo), amplía pues considerablemente las posibilidades de aplicación (Hoppe y Higgins, 1992). En la Tabla 5 se presentan algunas de las aplicaciones comerciales del suero como ingrediente en alimentos. Dentro de estas

aplicaciones hay que destacar la fabricación de bebidas no alcohólicas, que está adquiriendo importancia en los últimos años. En muchos países del centro y norte de Europa se fabrican bebidas, frecuentemente con sabor a frutas, cuya base de formulación es el suero (Holsinger y col., 1974; Jelen, 1992; Anónimo, 1996; Mann, 1996). Algunas de ellas ya se encuentran disponibles comercialmente en nuestro país.

Tabla 5. Aplicaciones del suero de quesería en polvo como ingrediente en alimentos.

Suero dulce

Quesos especiales
Requesón
Helados
Panes, bollos, galletas
Glaseados, caramelos y recubrimientos para caramelos, chocolate
Margarina, salsas, tentempiés
Zumos de frutas y otras bebidas
Sopas, alimentos infantiles
Productos cárnicos

Suero ácido

Bebidas con sabor a fruta y productos lácteos fermentados
Quesos procesados
Galletas, panes y bollos.
Aderezos
Sorbetes
Salchichas y otros productos cárnicos

Tomado de Morr (1992) y Yang y Silva (1995).

En diversos países (principalmente Italia) se utilizan pequeñas cantidades de suero crudo como *cultivo iniciador* para la fabricación de quesos como el Provolone, Grana, Mozzarella, Oaxaca, Gruyere o Emmental (Valles y Moquot, 1972; Giraffa y col., 1992; Neviani y col., 1992; Reinheimer y col., 1995; Aguilar y col., 1998; Montero y col.,

1998). Para este uso, se somete previamente el suero fresco a un proceso de incubación, para promover el crecimiento de la microflora específica para la maduración de esos quesos. También se han empleado sueros como medio de cultivo, para el desarrollo de cultivos iniciadores destinados a la fabricación de yogures, mantequilla, etc. (Mathur y Shahani, 1979).

Aunque en muchas ocasiones se requiere su suplementación con nutrientes, o el uso de tratamientos previos, el suero constituye un excelente medio de cultivo para un amplio número de microorganismos. Se han desarrollado diversos procesos biotecnológicos, de bioconversión o fermentación del suero, orientados a la obtención de diversos tipos de materiales: a) *productos que se obtienen en grandes volúmenes, pero con un valor comercial relativamente bajo*, como es el caso del metano, el etanol, la biomasa proteica, o los efluentes tras la depuración; b) *productos con un valor comercial mayor y que también se producen en grandes cantidades* (ingredientes o aditivos para alimentación animal o humana, levaduras de panadería, aminoácidos, polisacáridos, etc.); y c) *los que se obtienen en volúmenes muy pequeños, pero con un valor comercial muy elevado*, tales como antibióticos y otros productos farmacéuticos, enzimas, vitaminas, etc.

Los procesos de bioconversión del suero se basan sobre todo en el uso de levaduras, y serán ampliamente descritos en la sección 5. 7. de esta Introducción. Sin embargo, también se pueden obtener diversos compuestos (alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, aromas, hormonas, aceites, polisacáridos) del cultivo de bacterias o mohos, algunos de los cuales figuran en la Tabla 6. Un ejemplo de productos no procedentes de levaduras es el acetato cálcico magnésico (CMA) empleado para sustituir a la sal en carreteras heladas (Yang y Silva, 1995). Otro caso es el del cultivo de *Shewarella putrefaciens* en suero dulce, para obtener ácidos grasos ω -3 empleables en dietas adecuadas para patologías cardiovasculares e inflamatorias (Cadieux y col., 1998).

En agricultura, y por su aptitud como fertilizante se está utilizando suero, dentro de determinados límites, para *riegos* de terrenos (Robbins y Lehrsch, 1998). El uso de suero para riego debe ser muy controlado ya que puede conducir a una excesiva salinización de los suelos (Zall, 1992; Yang y Silva, 1995). Recientemente, se ha visto que la adición conjunta de suero y paja a terrenos calcáreos susceptibles de erosión, puede mejorar su

Tabla 6. Productos derivados del cultivo de algunas bacterias y mohos en suero de quesería y permeado.

PRODUCTO	MICROORGANISMO	MEDIO UTILIZADO	REF.
Metano	Bacterias anaerobias obligadas y facultativas	Suero, Permeado, Efluentes lácteos	(3, 7, 9)
Antibióticos	<i>Penicillium</i> sp.	Suero hidrolizado	(3)
Ácido láctico	Bacterias lácticas, homo- y heterofermentativas	Suero o permeado con o sin suplementación	(3, 9, 10, 13)
Lactato amónico	Bacterias lácticas	Permeado y urea.	(1, 3, 4)
Acetato cálcico magnésico (CMA)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Clostridium formicoaceticum</i>	Suero	(9)
Ácido acético	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Clostridium formicoaceticum</i> <i>Acetobacter</i> sp. <i>Clostridium perfringens</i> <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Suero o permeado suplementados	(3, 6, 8, 9, 11)
Ácido butírico	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Suero	(6, 8)
Ácido propiónico	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Propionibacterium acidipropionici</i> <i>Propionibacterium</i> sp.	Permeado	(3, 6, 8, 9)
Acetona-Butanol Iso-Propanol	<i>Clostridium</i> sp.	Permeado	(3, 4, 5, 9)
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Permeado	(3, 9)
Aceites	Varios hongos	Permeado	(9)
β -galactosidasa	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>E. coli</i>	Suero o permeado con o sin suplemento, con o sin hidrólisis de lactosa	(3, 9, 12)
Vitamina B ₁₂	<i>Propionibacterium</i> sp. <i>Clostridium</i> sp.	Suero	(2, 3, 9)
Riboflavina	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Suero	(3)
Insecticidas	<i>Bacillus</i> sp.	Suero hidrolizado	(3, 9)
Polisacáridos (xantano)	<i>Xanthomonas</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Alcaligenes</i> sp. <i>Zooglea</i> sp.	Suero	(3)
Diacetilo	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Suero	(3)
Acido giberélico	<i>Fusarium moniliforme</i>	Suero	3
Aminoácidos	Diversas bacterias, <i>E. coli</i> modificado	Suero	(3, 9)

(1) Juengst (1979); (2) Marwaha y col. (1983); (3) Hobman (1984); (4) Zadow (1984); (5) Schoutens y Groot (1985); (6) Sorlini y col. (1993); (7) Mawson (1994); (8) Sorlini y Daffonchio (1995); (9) Yang y Silva (1995); (10) Moya Mora y Fuertes González (1996); (11) Huang y Yang (1998); (12) Murad (1998) y (13) Selmer-Olsen y Sørhaug (1998).

estabilidad y permeabilidad (Brown y col., 1998). Esta aplicación podría ser de interés en nuestro país, de gran tradición en el cultivo de cereales y con serios problemas de erosión.

Otras aplicaciones del suero son la producción de espumas de poliuretano y resinas de termosellado para conglomerar materiales lignocelulósicos, y para agregar las menas de minerales para su posterior peletización (Chambers y Ferretti, 1979; Yang y Silva, 1995). El suero es también un excelente co-sustrato para el cultivo de algunas setas, como *Morchella* (Hobman, 1984; Kilara y Patel, 1992).

2. 3. 3. 2. Utilización del suero fraccionado

En muchas ocasiones el suero es aprovechado de manera fraccionada. El fraccionamiento más elemental es la desmineralización (por electrodiálisis, ósmosis inversa y otros procedimientos) que elimina el sabor metálico del suero y permite mayor rango de aplicaciones. Comúnmente, sin embargo, el fraccionamiento pretende la recuperación de las proteínas o la lactosa, aunque la tendencia es a recuperar también otros componentes minoritarios incluidas las sales, que se aprovechan para la fabricación de bebidas funcionales en Japón y Finlandia (Horton, 1995).

El primer paso del fraccionamiento del suero para la separación de las proteínas se lleva a cabo generalmente por ultrafiltración, o por desnaturalización térmica y/o isoelectrica; las proteínas desnaturalizadas se recuperan por decantación o centrifugación (Hobman, 1992). La desproteinización da lugar a un subproducto líquido que posee todavía el 90% de los sólidos del suero. La ultrafiltración se realiza a través de membranas semipermeables, que en el caso del suero excluyen moléculas con peso molecular superior a 15.000-25.000 daltons. El proceso se realiza a presión, y el flujo del líquido es tangencial a la membrana. La solución que atraviesa la membrana se denomina *permeado* y contiene, además de agua y lactosa, minerales y nitrógeno no proteico. Al líquido que no atraviesa la membrana, se le llama *retenido* y es un concentrado de proteínas y restos de grasa, además de incluir lactosa y sales en la misma concentración que el suero. Para rebajar la concentración de moléculas de pequeño tamaño, se puede añadir agua al retenido y filtrarlo de nuevo (lo que se llama diafiltración).

a. Proteínas

Las proteínas del suero representan el 20% del total de proteínas de la leche. Aproximadamente un 50% de las seroproteínas corresponde a la β -lactoglobulina y un 12-20% a la α -lactoalbúmina; el resto está constituido por inmunoglobulinas, seroalbúmina bovina (BSA), lactoferrinas, lactoperoxidasa, caseín macropéptido (CMP) y otras fracciones peptídicas (Renner, 1992; Morr y Ha, 1993; González Siso, 1996; Clare, 1998). Como ya se ha indicado, estas proteínas tienen un alto valor nutricional, por lo que se aprovechan sobre todo en preparados para lactantes y niños de corta edad. Sus propiedades funcionales son excelentes, por lo que su utilización como ingrediente en todo tipo de alimentos está aumentando considerablemente en los últimos años (Mann, 1997a); cabe destacar sus cualidades como emulsionante y espumante, su alta solubilidad, su gran aptitud gelificante y adhesiva y su elevada capacidad de retención de agua (Mangino, 1992; Morr y Ha, 1993; Castillo y col., 1996; De Wit, 1998; Ju y Kilara, 1998).

Aunque la separación por desnaturalización térmica provoca la pérdida de las propiedades funcionales de las proteínas séricas, no modifica sus propiedades nutritivas, por lo que, a menudo se obtienen así preparaciones de lactoalbúmina (Pearce, 1992; Morr y Ha, 1993; Castillo y col., 1996).

Se han desarrollado diversos procedimientos para la recuperación y fraccionamiento de las proteínas del suero, como precipitación con polielectrolitos (cloruro férrico, carboximetilcelulosa, polifosfatos) o distintos tipos de cromatografía (de intercambio iónico, criba molecular, inmunoafinidad), además de técnicas combinadas (Pearce, 1992; Morr y Ha, 1993; Castillo y col., 1996; Kim y Li-Chan, 1998).

Los derivados del suero más conocidos son los concentrados proteicos, conocidos por las siglas WPC (Whey Protein Concentrate) (Morr y Ha, 1993; De Wit, 1998), y obtenidos por ultrafiltración, diafiltración y secado (Mangino, 1992). Los WPC tienen entre un 35- 75% de proteínas (Pearce, 1992; Morr y Ha, 1993; De Wit, 1998) y se emplean en productos lácteos, tentempiés, caramelos, chocolates, sopas, salsas, películas y recubrimientos comestibles, productos de panadería y cárnicos, alimentos dietéticos, bebidas, etc. (Mathur y Shahani, 1979; Mangino, 1992; Morr y Ha, 1993; Banerjee y

Chen, 1995; Brun y Dalglish, 1997; Le Hénaff y col., 1997; De Wit, 1998; Gogoi y col., 1998; Kailasapathy y Supriadi, 1998; Kim y Ustunol, 1998; Levy y McGregor, 1998; Sherwin y col., 1998).

El desarrollo de los procedimientos de separación por membranas ha permitido la obtención de productos mejorados, como los “aislados proteicos” o WPI (Whey Protein Isolates), que se obtienen combinando ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico, y cuyo contenido en proteínas es mayor (90-95%) (Castillo y col., 1996; De Wit, 1998). Su calidad funcional y el hecho de estar prácticamente libres de lactosa, grasa y minerales, hace a los WPI muy versátiles e idóneos para muy diversas aplicaciones como ingredientes funcionales y nutritivos (Morr y Ha, 1993; Castillo y col., 1996, De Wit, 1998). Un ejemplo de aplicación de alto valor añadido son los geles microparticulados empleados como imitadores de grasas (Simplese, Trailblazer). Los WPI sirven también para elaborar películas comestibles (Banerjee y Chen, 1995; Miller y col., 1998; Yildirim y Hettiarachchy, 1998) y se está estudiando la posibilidad de hacer con estas proteínas microcápsulas para vehicular sustancias líquidas fácilmente oxidables (Rosenberg y col., 1998; Sheu y Rosenberg, 1998).

Para algunas aplicaciones son particularmente adecuadas las proteínas de suero texturizantes, WPT (Whey Protein Texturizer), que poseen excelentes cualidades emulsificantes utilizables en surimis, salsas, productos cárnicos prensados, etc. (Thomsen, 1995).

Existen ya en el mercado preparados de seroproteínas hidrolizadas (WPP –Whey Protein-hydrolyzed Peptides) con propiedades de digestibilidad y solubilidad mejoradas (Castillo y col., 1996; Zhang y Farkye, 1998).

Actualmente se tiende al fraccionamiento de especies proteicas con propiedades específicas, de tipo funcional, nutricional o farmacológico. Así, por ejemplo, se obtiene la β -lactoglobulina para su uso en carnes reestructuradas y alimentos para deportistas. Las inmunoglobulinas y BSA se emplean en dietas para enfermos de Parkinson y en inmunoterapia (SIDA, cáncer). La lactoferrina puede emplearse en preparaciones antianémicas y dietas infantiles; además de como agente antimicrobiano igual que la

lactoperoxidasa (Dalev, 1994; Yang y Silva, 1995; Mann, 1997a; Mann, 1997b; Kim y Li-Chan, 1998). Recientemente están recibiendo mucha atención las propiedades y posibilidades de aprovechamiento del CMP (también denominado glicomacropéptido, o GMP) que en ocasiones puede llegar a representar hasta el 15% de las proteínas del suero; sus posibilidades para la elaboración de dietas para fenilcetonúricos son prometedoras ya que carece de aminoácidos aromáticos, además de poseer excelente capacidad emulsificante y buena solubilidad en intervalos amplios de pH y temperatura (Clare, 1998).

b. *Lactosa*

Considerada como “el azúcar de la leche”, la lactosa (4-*o*- β -D-galactopyranosyl-D-glucopiranosido) constituye el 70-80% del total de los sólidos del suero (Hobman, 1984; Zadow, 1984; Harper, 1992; Zall, 1992) y es el principal responsable de su DQO (Zadow, 1992; Zall, 1992).

La utilización de este azúcar, poco dulce y poco soluble, ha sido objeto de numerosas revisiones (Hobman, 1984; Zadow, 1984; Zadow, 1992; Yang y Silva, 1995). Se puede obtener a partir de todo tipo de sueros y derivados (Harper, 1992); mientras que en Europa generalmente se obtiene mayoritariamente de sueros, en Estados Unidos se prefiere el permeado como materia prima (Yang y Silva, 1995). Se purifica frecuentemente mediante un proceso de cristalización, a partir de soluciones supersaturadas (Hobman, 1984; Harper, 1992; Yang y Silva, 1995; Castillo y col., 1996; González Siso, 1996). También se puede separar por precipitación con metales alcalinos (proceso *Steffen*) o mediante precipitación con alcoholes u otros solventes (Harper, 1992; Yang y Silva, 1995).

La lactosa se utiliza comúnmente como ingrediente en alimentos infantiles, para aportar niveles similares a los presentes en leche humana (7%). Se incluye también, en la formulación de muchos alimentos (sopas y salsas instantáneas, pastas, panadería y confitería, productos lácteos como leche condensada y helados, bebidas instantáneas, aderezos, salchichas y otros derivados cárnicos, frutas en conserva, mermeladas,

chocolates) (Zadow, 1984; Harper, 1992; Yang y Silva, 1995; Morr y Barrantes, 1998). Las principales propiedades por las que se utiliza este disacárido en alimentos son el bajo poder edulcorante, la aptitud para la fijación de aromas, la adsorción de pigmentos y volátiles, el poder emulsificante y agregante, la mejora de la textura, la participación en reacciones de Maillard (favoreciendo la coloración tostada típica de los productos de panadería) y la potenciación de la absorción intestinal del calcio (Zadow, 1984; Harper, 1992; Yang y Silva, 1995). También se emplea frecuentemente como excipiente en la fabricación de medicamentos como píldoras o pastillas y como sustrato en los cultivos para la producción de antibióticos (Zadow, 1984; Harper, 1992). Se utiliza además, para la producción de espumas rígidas de poliuretano, empleadas como materiales de construcción y para embalaje (Hu y col., 1997).

Dados los excedentes de lactosa en el mercado, se están desarrollando procedimientos para su transformación. Algunos de sus derivados, descritos a continuación, están adquiriendo gran importancia como aditivos para alimentos convencionales o funcionales y se comentan a continuación.

Lactulosa. (4- α -D-galactopiranosil-D-fructosa). Isómero de la lactosa en el que la glucosa se convierte en fructosa. Se forma en condiciones alcalinas y, en pequeñas cantidades, aparece en la leche sometida a tratamientos térmicos intensos. De valor terapéutico por su acción laxante, se utiliza para tratar el estreñimiento. También se emplea en el tratamiento de la hepatoencefalia por inhibir en el intestino el crecimiento de microorganismos productores de amonio (Harper, 1992; Horton, 1995; Yang y Silva, 1995). Considerado como ingrediente probiótico, ya que no se digiere en el intestino y facilita el crecimiento de las bifidobacterias (Yang y Silva, 1995), tiene un poder edulcorante 50% superior a la de la sacarosa.

Lactitol. (4- α -D-galactopiranosil-D-glucitol). Se obtiene por reducción de la lactosa. Al igual que la lactulosa no se digiere en el intestino, por lo que tiene un efecto similar sobre la flora intestinal. Es además, un edulcorante no cariogénico y de bajo contenido calórico (2 Kcal/g) (González Siso, 1996) cuyo uso en alimentos está autorizado en la UE (Horton, 1995; Yang y Silva, 1995).

Esteres de lactitol. Se emplean industrialmente como surfactantes, detergentes industriales y emulsionantes en alimentos (Yang y Silva, 1995).

Acido lactobiónico. (4- α -D-galactopiranosil-D-ácido glucónico). Se obtiene por oxidación de la lactosa, y se emplea en las soluciones de mantenimiento de órganos que van a ser transplantados (Yang y Silva, 1995). También utilizado como acidulante alimentario (Zadow, 1984).

Lactosil-urea. Se usa para alimentación de rumiantes ya que da a la urea un sabor más agradable y hace posible el aprovechamiento del nitrógeno no proteico (Yang y Silva, 1995; González Siso, 1996).

Galactooligosacáridos (GalOS). Se forman a partir de la lactosa por reacciones de transgalactosidación (Zárate y López-Leiva, 1990; Yang y Silva, 1995). Estos compuestos, al igual que la lactulosa, se están utilizando cada vez más como ingredientes en la formulación de alimentos funcionales. Son bifidogénicos, no cariogénicos, de bajo poder calórico y aptos para diabéticos. La formación de estos compuestos se trata con mayor amplitud en el apartado 6. 2. de esta introducción.

Las aplicaciones del suero y de la lactosa se pueden ampliar mediante la hidrólisis de este azúcar. Para empezar, esto aumenta la solubilidad, el poder edulcorante y el pardeamiento enzimático. Además, las personas y animales intolerantes a la lactosa que al no poder digerir este azúcar, sufren molestias intestinales (gases, retortijones y hasta diarreas) al ingerir leche o derivados, pueden consumir las variantes de estos productos con la lactosa hidrolizada y beneficiarse de su valor nutritivo. La generación de glucosa por este procedimiento aumenta además el espectro de microorganismos que se pueden cultivar en el suero (Yang y Silva, 1995; González Siso, 1996).

La lactosa se puede hidrolizar por métodos químicos (hidrólisis ácida) o enzimáticos (empleo de β -D-galactosidasa) (Dicker, 1982; Gekas y López-Leiva, 1985). Estos últimos se tratarán en el apartado 6 de esta introducción. La hidrólisis ácida requiere unas condiciones de pH y temperatura extremadamente severas (pH entre 1-2 y temperaturas de 100-150°C), y se puede realizar por adición de ácido clorhídrico o sulfúrico a la solución (hidrólisis ácida homogénea) (Lin y Nickerson, 1976; Zadow, 1992) o mediante el empleo

de resinas de intercambio catiónico (hidrólisis ácida heterogénea) (Dicker, 1982; Hobman, 1984; Gekas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992). Aunque con estas técnicas se obtienen porcentajes de hidrólisis del 80%, su uso está muy limitado a sueros desproteinizados y desmineralizados. En sueros completos, se desnaturalizan las proteínas y se neutralizan los ácidos añadidos. Además, los hidrolizados obtenidos por métodos químicos han de someterse a un posterior tratamiento de decoloración debido al pardeamiento causado por la reacción de Maillard (Gekas y López-Leiva, 1985).

2. 3. 3. Tasas de aprovechamiento del suero de quesería

Desde hace más de 50 años se mantiene la búsqueda de procedimientos para el aprovechamiento del suero; sin embargo, aún ahora la mitad de la producción tanto en Europa como en EEUU, se descarga como efluente o se utiliza para riego (Marwaha y Kennedy, 1988; Yang y Silva, 1995; González Siso, 1996).

En 1995 en EEUU más del 60% del suero obtenido se dedicó a la producción de suero en polvo, un 40% del cual se destinó al consumo humano (Yang y Silva, 1995; De Wit, 1998); otra parte importante (casi el 15%) se destina a la obtención de lactosa refinada (Yang y Silva, 1995).

Los datos más recientes indican que aproximadamente un 60% del suero europeo está siendo aprovechado (De Wit, 1998). De esta cantidad, un 45% se emplea directamente en forma líquida, un 30% se deshidrata, un 15% se destina a la obtención de lactosa o productos delactosados y el resto se emplea para la obtención de WPC (González Siso, 1996). Una buena parte del suero en polvo se destina a la alimentación animal (Comegna, 1996). En 1991, en Europa sólo el 14% del suero en polvo se destinaba al consumo humano (De Wit, 1998). En 1995, de las 824.000 Tm de suero en polvo producidas en la UE, aproximadamente el 13% había sido desmineralizado para su uso, mayoritariamente en alimentos infantiles (De Wit, 1998).

La recuperación de proteínas (WPC y WPI) es la forma de aprovechamiento que más se ha incrementado en los últimos años (Mann, 1997a; De Wit, 1998). Esto es debido a su más frecuente utilización en alimentos funcionales y dietas para deportistas, a un

aumento de la producción de lactoferrina para fórmulas infantiles, y a la aparición de técnicas más eficaces de separación de proteínas (Mann, 1997a). Japón, que produce poco queso, ha introducido diversas innovaciones sobre fraccionamiento y aprovechamiento altamente selectivo del suero. En 1995 se estimó para Europa, una producción de unas 190.000 Tm de productos enriquecidos en seroproteínas, de ellas 40.000 Tm de WPI, lo que representaba el 56 y 72% de la producción mundial, respectivamente (De Wit, 1998). A nivel mundial, la producción anual de proteínas lácteas purificadas se estima en unas 230 Tm de lactoalbúmina, cerca de las 11 Tm de lactoferrina y unos 2.300 Kg de lactoperoxidasa (Horton, 1995).

Se estima que en 1995 la producción mundial de lactosa fue de 460.000 Tm, 280.000 de las cuales procedentes de la UE (De Wit, 1998). Se ha producido recientemente un gran aumento en la utilización de permeado concentrado y lactosa en alimentación animal (Mann, 1997a). El uso de lactosa en la fabricación de caramelos reemplazando a la leche, se dobló de 1990 a 1991 (Yang y Silva, 1995).

Otra forma de aprovechamiento a pequeña escala, la producción mundial de lactulosa, alcanzó unas 20.000 Tm en 1992 (Yang y Silva, 1995). La producción anual de CMA (acetato cálcico magnésico), utilizable para deshelar carreteras, es inferior a las 10.000 Tm (sin embargo, sólo en EEUU y Canadá se vienen usando del orden de 9 a 13 millones de Tm de sal para este fin) (Yang y Silva, 1995).

En España el número de queserías que procesan lactosuero se limita básicamente a unas 10 empresas. Algunas sólo poseen torres de secado de suero dedicado en su mayor parte a la elaboración de piensos (principal producto que se comercializa) (FENIL, 1998). En mucha menor proporción se destina el suero seco a la industria alimentaria. Sólo 4 industrias españolas (2 de ellas queserías) realizan fraccionamiento del suero (lactosa y WPC) que en su mayor parte consumen empresas del mismo grupo, como ingredientes para la elaboración de alimentos infantiles, bollería y helados (FENIL, 1998). Hay que señalar sin embargo, que algunas queserías de tamaño medio y cooperativas de pequeñas industrias, comienzan a interesarse en sistemas de aprovechamiento. Existen por otra parte tres industrias independientes que se dedican a la recogida de sueros líquidos o concentrados de diversas queserías. De ellas, dos fabrican derivados y la tercera sólo seca

el suero que destina a la venta para piensos (FENIL, 1998). Curiosamente, y a pesar del escaso aprovechamiento, en España se está importando cada vez más proteína concentrada (FENIL, 1998), lo que resalta la conveniencia de explotar esta alternativa.

Según datos estimados por la FENIL (1998) la producción anual de suero en polvo en España estaba en 1997 por debajo de las 50.000-60.000 Tm, y la de lactosa se cifraba en unas 2.500 Tm. Actualmente, existen varios proyectos de asociación de varias queserías para la puesta en funcionamiento de plantas de procesado y secado de sueros (Alimarket, 1998).

3. RESIDUOS ALIMENTARIOS

3.1. Residuos sólidos

La mayor parte de los residuos sólidos procedentes de industrias que procesan alimentos de origen vegetal son “asimilables a”, o eliminables como, residuos sólidos urbanos y por tanto deben cumplir lo dispuesto en la Ley 10/1998. Sin embargo, las tierras separadas durante las fases de recepción y limpieza de las materias primas se pueden destinar a su valorización para tratamiento de los suelos, tal y como indica el apartado R.10 del anexo II.B de la Decisión 96/350/CE.

Los residuos de origen animal, y en especial los de mataderos, deben por razones sanitarias, transformarse para la elaboración de piensos o eliminarse por procedimientos especiales legislados en el Real Decreto 2224/1993. Esta norma es de aplicación cuando la escasa cantidad de los residuos, la distancia o la dificultad de acceso a los centros de transformación, encarece mucho su recogida. Su objetivo es proteger a personas o animales de agentes patógenos procedentes de animales o desperdicios animales (incluidos pescados y productos de origen animal), infectados o sospechosos de estarlo, así como de evitar la transmisión de enfermedades epizoóticas que puedan propagarse durante el transporte a las plantas de transformación. También incluye las medidas a adoptar con los animales afectados de enfermedades graves y a los continentes de residuos que puedan amenazar a la salud humana o animal de no aplicarseles a un tratamiento térmico adecuado.

3. 2. Residuos líquidos

En este apartado se resumen las principales características de los vertidos líquidos de la industria alimentaria, presentados de forma sectorial y prestando especial atención a los de origen lácteo. Dichas características determinan la elección y eficacia de los tratamientos de depuración, que se abordan en el siguiente apartado de esta Introducción.

3. 2. 1 *Residuos líquidos de origen vegetal*

Los ciclos productivos típicos de las industrias transformadoras de **frutas y hortalizas** se reflejan en la heterogeneidad de sus vertidos. Sus aguas residuales incluyen los líquidos empleados en el lavado, pelado y escaldado de los vegetales y los de lavado de las instalaciones, que incluyen agentes de limpieza y desinfección (Wheatley, 1994). Estos efluentes se caracterizan por su riqueza en sólidos inertes fácilmente sedimentables (arenas), por algunos en restos vegetales fácilmente separables por flotación (semillas, tallos, vainas, hojas) y por tener un pH bastante variable (Tarbox, 1993). El mayor caudal de efluentes de las plantas de elaboración de conservas y productos congelados corresponde a las aguas empleadas en lavado y pelado de materias primas; éstas pueden alcanzar un volumen de 15.000- 30.000 L por Tm de producto procesado, mientras que las procedentes del escaldado oscilan entre los 5.000 y 10.000 L (Tarbox, 1993). El tipo de pelado condiciona enormemente la carga contaminante de estas aguas. Cuando el pelado se realiza en caliente por inmersión en una solución del 10- 15 % de hidróxido sódico o potásico, además de aumentarse el pH del efluente, se favorece la solubilización de la materia orgánica, particularmente de polisacáridos (Tarbox, 1993). Aunque esta práctica continúa siendo común en el procesado de algunas frutas como melocotones, albaricoques, nectarinas y peras, y de determinadas hortalizas como la patata (Ramaswamy y Abbatemarco, 1996), actualmente es frecuente realizar el pelado en seco para disminuir la contaminación de las aguas (Tarbox, 1993). Se está introduciendo el pelado mediante uso de enzimas, lo que conlleva peladuras más finas como residuo sólido y solubilización de materiales de bajo peso molecular y de las propias enzimas, en el efluente. Los efluentes con valores de DQO más altos (> 4000 mg/L) proceden de las

industrias transformadoras de patatas y guisantes, debido a que su almidón se libera con mayor facilidad (Wheatley, 1994). Por otro lado, cabe destacar la riqueza en ácidos orgánicos y la escasez de compuestos nitrogenados y fósforo en los efluentes procedentes de la obtención de zumos de frutas (Tarbox, 1993).

Una actividad alimentaria que requiere consideración especial desde el punto de vista contaminante, es la **obtención de almidón** a partir de diversas fuentes como maíz, arroz, harina y patatas, entre otras. Estas industrias generan vertidos con un elevado poder contaminante (> 10.000 mg/L de DQO), conteniendo una gran proporción de la materia orgánica en estado coloidal, por lo que su biodegradación es bastante lenta (Wheatley, 1994). La hidrólisis del almidón se emplea a menudo como pre-tratamiento en el proceso de depuración de estas aguas para favorecer su bioconversión durante los tratamientos biológicos posteriores (Wheatley, 1994).

Los efluentes derivados de la **producción de azúcar** son también de carácter estacional, y proceden principalmente del lavado y aclarado de las materias primas (en Europa de la remolacha azucarera), operaciones en las que la DQO de las aguas puede alcanzar los 10.000-20.000 mg/L (Wheatley, 1994). El encalado realizado durante el proceso productivo para la precipitación de impurezas, además de favorecer la reutilización parcial de las aguas y reducir su DQO, contribuye a la conveniente formación de flóculos por parte de la microbiota de los reactores anaerobios (Wheatley, 1994). El caudal vertido por las industrias que disponen de sistemas de recirculación de aguas se ha estimado en unos 12.000 L por Tm de remolacha procesada (Tarbox, 1993), con una DQO de aproximadamente 3.000-10.000 mg/L y un contenido en ácidos carboxílicos superior a 6g/L (Wheatley, 1994).

Las aguas residuales generadas durante la extracción del **aceite de oliva** reciben el nombre de alpechines o aguas de vegetación. De carácter ácido (pH 4,5-5,2), aspecto oscuro y olor desagradable, los vertidos de las almazaras varían ostensiblemente en su volumen y composición dependiendo de la variedad de aceituna, época de recolección, climatología, tipo de suelo de cultivo y sobre todo, del sistema de extracción del aceite (Di Giovacchio, 1998; Civantos y col., 1992; García Rodríguez, 1991). Si la extracción se realiza por prensado, se generan del orden de 0,5-0,8 L de alpechín por cada Kg de

aceituna procesado (Hamdi, 1996; Civantos y col., 1992) y con un poder contaminante muy elevado, 120.000-130.000 mg/l de DQO (Fiestas y Borja, 1991). Si se emplea centrifugación en continuo (la aceituna molida y batida con agua, se centrifuga en un decantador o centrífuga horizontal que separa 3 fases diferentes: orujos, alpechines y aceite), se producen mayores volúmenes de alpechines más diluidos (0,9-1,2 L/Kg aceituna) y con carga contaminante inferior, 45.000–80.000 mg/L DQO (Uceda Ojeda y col., 1995; Civantos y col., 1992; Fiestas y Borja, 1991). Los azúcares, mucho más elevados en los alpechines de prensado (20-80 g/L), que en los de centrifugación (5-26 g/L) (Civantos y col., 1992; García Rodríguez, 1991), son uno de los componentes orgánicos mayoritarios. La biodegradabilidad de los alpechines es sin embargo bastante baja, ya que la presencia de grandes cantidades de compuestos fenólicos (10-24 g/L en prensado y 3-8 g/L en centrifugación) (Civantos y col., 1992; García Rodríguez, 1991) tiene un fuerte efecto antimicrobiano (Fiestas y Borja, 1991). Aunque poseen una carga contaminante inferior, los alpechines de centrifugación presentan niveles de SS superiores a los de prensado (9.000 mg/L frente a 1.000 mg/L; Civantos y col., 1992; Fiestas y Borja, 1991), y un mayor contenido en grasas emulsionadas (3.000-10.000 mg/L frente a 300-4.500 mg/L) (Uceda Ojeda y col., 1995; Fiestas y Borja, 1991). El resto de los componentes característicos de los alpechines, se encuentran en similar proporción en los de prensado y centrifugación e incluyen sustancias nitrogenadas (1-25 g/L), ácidos orgánicos (5-15 g/L), polialcoholes (10-15 g/L), hemicelulosas, pectinas, mucílagos y taninos (10 g/L) (García Rodríguez, 1991). Al igual que los materiales orgánicos, los contenidos minerales son más elevados en los alpechines de prensado (15 g/L frente a 4 g/L en los de centrifugación), siendo el potasio y el fósforo los elementos mayoritarios (> 1 g/L) (Civantos y col., 1992; Kiritsakis, 1992).

En ambos vertidos, en general, los procesos sencillos de depuración son insuficientes, y el empleo de tratamientos biológicos está limitado por la presencia de fenoles (Fiestas Ros y col., 1992; Hamdi, 1996) y de ácidos grasos de cadena larga (Hamdi, 1996). La bioconversión mediante hongos o bacterias capaces de degradar estos compuestos, es necesaria antes de aplicar otros procesos de depuración (Fiestas Ros y col., 1992; Hamdi, 1996).

A principio de los años 90 se empezaron a implantar en la industria aceitera los procesos de centrifugación de 2 fases (que separan el aceite del resto de los componentes, denominados alperujos), promovidos principalmente por exigencias medioambientales (Di Giovacchio, 1998; Uceda Ojeda y col., 1995). La mayor parte de los componentes del alpechín quedan así retenidos en el alperujo, cuyo destino, a pesar de su mayor contenido acuoso, es similar, tras un secado más intenso, al de los orujos tradicionales (Suria Guasch, 1996). La fase oleosa separada arrastra pequeñas cantidades de alpechín (0,036-0,2 L/Kg aceituna), de bajo contenido graso (400 mg/L; Uceda Ojeda y col., 1995), cuya carga contaminante (expresada en DQO) es 8-10 veces inferior a la del procedente de un decantador de 3 fases (Uceda Ojeda y col., 1995; Civantos y col., 1992).

Los efluentes producidos durante la obtención y refinado de aceites comestibles no de oliva presentan una DBO_5 comprendida entre 500 y 6.700 mg/L, SS de 540–5.800 mg/L, y un alto contenido en grasas (300–4.200 mg/L) (Tarbox, 1993). Estos aceites se obtienen por extracción con disolventes, y la mayor parte provienen de semillas de girasol, colza y soja (Zúñiga y col., 1995). Los disolventes empleados son generalmente hexano, heptano o ciclohexano (Brennan y col., 1998), y tras su límite de reciclaje no deben ser mezclados con el resto de las aguas residuales, ya que están catalogados como Residuos Tóxicos y Peligrosos (Ley 20/1986; RD 952/1997). Dado que según la legislación, se debe minimizar en general el uso de estos compuestos, se están investigando diversas alternativas, tales como el empleo de enzimas (celulasas, hemicelulasas, amilasas, pectinasas, proteasas, etc.) para facilitar la acción de los solventes (Domínguez y col.; 1995; Zúñiga y col., 1995) y para desarrollar la extracción con fluidos supercríticos como el CO_2 , no tóxico y de manejo más sencillo que los solventes orgánicos (Cocero y Calvo, 1995).

Dentro del sector de **bebidas alcohólicas**, las industrias dedicadas a la fabricación de cerveza son las que producen un mayor volumen de vertidos (Wheatley, 1994). Se ha estimado que este tipo de industrias descargan entre 2,4 y 9 L de agua residual por cada L de cerveza producido (Tarbox, 1993). Su carga contaminante es, sin embargo, moderada en comparación con la de otros sectores; la DQO oscila entre 500 y 1.800 mg/L, de la cual el 60% procede de las aguas de lavado de los tanques de fermentación y el contenido en

SS suele ser de 240-800 mg/L (Hough, 1990; Wheatley, 1994). La relación DBO/DQO se sitúa entorno a 0,67; son pues vertidos fácilmente biodegradables durante los tratamientos aerobios normalmente empleados en la depuración (Wheatley, 1994).

El mayor gasto de agua en el subsector vinícola deriva de las operaciones de prensado, trasiegos y limpieza de las cubas y botellas. Las bodegas producen efluentes cuya carga contaminante es debida fundamentalmente a la cantidad de sólidos presentes. Así, si incluyen las heces del vino, la DQO puede alcanzar los 100.000 mg/L (Vogt, 1984).

Sin lugar a dudas, los efluentes con mayor poder contaminante de este sector son los procedentes de destilerías, con valores de DQO comprendidos entre 10.000 y 60.000 mg/L (Tarbox, 1993; Wheatley, 1994). El consumo de agua en estas industrias es de alrededor de 10 L por L de aguardiente elaborado (Wheatley, 1994). Tanto los efluentes generados en procesos que emplean cereales como materia prima (whisky, ginebra, vodka), como los procedentes de la transformación de melazas (ron), poseen frecuentemente niveles elevados de sulfatos (3.000-8.000 mg/L; Wheatley, 1994). Estos compuestos estimulan, durante los procesos de depuración anaerobios, el crecimiento de bacterias sulfato-reductoras, las cuales compiten con las bacterias metanogénicas para la captación de sustratos (H_2 y ácido acético). Además, algunos de sus productos metabólicos, como el SH_2 , ejercen un efecto tóxico sobre la microbiota depuradora (Percheron y col, 1997). Dado que el pH ácido de estos efluentes (3,5- 4) imposibilita a menudo su tratamiento aerobio, se están realizando numerosos esfuerzos para solventar la ineficacia de los sistemas anaerobios derivada de la presencia de sulfatos procurando, por ejemplo, su precipitación mediante adición de hierro, níquel y otros minerales (Tarbox, 1993; Percheron y col., 1997).

3. 2. 2. Residuos líquidos de origen animal

El sector cárnico es uno de los más problemáticos en cuanto a la generación de aguas residuales, destacando las procedentes de mataderos (Johns, 1995; Núñez y col., 1998). En España, se ha estimado que los mataderos (excluyendo los de aves) generan un

caudal equivalente a una población de 350.000 personas, con un poder contaminante equiparable a 2,3 millones e-h (equivalente-habitante) (Núñez y col., 1998). Los efluentes de matadero incluyen aguas de lavado, detergentes y desinfectantes, restos de sangre y otros fluidos corporales, así como residuos sólidos de pequeño tamaño, englobando a menudo gran parte del contenido intestinal (Ockerman y Hansen, 1994). La retirada por vía seca del contenido intestinal y otros sólidos, junto con el aprovechamiento de la sangre, son las estrategias más eficaces para reducir la carga contaminante de estas aguas (Tarbox, 1993; Núñez y col., 1998). Se estima que por cada Kg de peso vivo faenado se generan entre 8 y 10 L de efluente, en cuya composición abunda el material nitrogenado (110- 740 mg/L) y graso (300- 890 mg/L), el fósforo (6-120 mg/L), así como algunos carbohidratos, en su mayoría componentes lignocelulósicos, procedentes del vaciado del tubo digestivo de los animales (Ockerman y Hansen, 1994; Johns, 1995; Núñez y col., 1998; Madrid, 1999). Una característica importante de estos efluentes es la presencia elevada de detergentes y desinfectantes, empleados para limitar las contaminaciones por bacterias coliformes fecales y otros microorganismos (Tarbox, 1993; Wheatley, 1994). Estos efluentes se caracterizan por poseer una DBO₅ de alrededor de 1.400–2.000 mg/L, 4.000-5.000 mg/L de DQO y 1.000–3.400 mg/L de SS (Johns, 1995; Núñez y col., 1998; Madrid, 1999). Dado que una gran parte de la carga contaminante se presenta en forma grosera como SS (40-50% de la DQO total; Johns, 1995), los procedimientos de elección para el tratamiento primario de estos efluentes son el desbaste, la decantación y la flotación por aire disuelto (Ockerman y Hansen, 1994; Johns, 1995; Núñez y col., 1998). Se calcula que aproximadamente dos tercios del total de los mataderos españoles depuran sus efluentes aplicando sólo este tipo de tratamientos (Núñez y col., 1998). No obstante, el tratamiento de las aguas por coagulación-floculación está recibiendo una buena acogida, ya que permite reducir la DQO en un 60 % y el contenido en SS en un 80 % (Núñez y col., 1998). Los mataderos de mayor tamaño, sin embargo, suelen aplicar un tratamiento biológico posterior, estando más arraigados en nuestro país los aerobios que los anaerobios (Núñez y col., 1998).

En los efluentes de las **industrias de transformación de productos de la pesca** abunda también el material proteico y graso. Un aspecto importante es la elevada

salinidad de las aguas empleadas en algunos procesos y productos; las altas concentraciones de sodio, cloruros, sulfatos y otros iones pueden resultar tóxicas para los tratamientos biológicos de depuración (Veiga y col., 1994). La carga contaminante oscila mucho en función del tipo de actividad; así la DQO se sitúa en torno a 2.000 mg/L en las industrias dedicadas al fileteado, a 50.000 mg/L en las conserveras y puede alcanzar los 120.000 mg/L en las fábricas de harinas de pescado (Veiga y col., 1994; Guerrero y col., 1997). Las aguas de cocción son las responsables de la mayor parte del poder contaminante de los efluentes de la industria conservera; su carga orgánica varía significativamente dependiendo de la especie procesada; así, puede alcanzar valores de DQO de 50.000 mg/L para el atún y de 16.900 mg/L para el mejillón (Veiga y col., 1994). El contenido en SS también depende del tipo de procesado, siendo de unos 700 mg/L en el fileteado y de 40.000 mg/L en la obtención de harinas (Veiga y col., 1994; Guerrero y col., 1997). Los procedimientos físico-químicos juegan un papel destacado en la depuración de efluentes de estas industrias, sobre todo, en aquellas dedicadas a la obtención de harinas, donde el material separado pueden incorporarse de nuevo a la línea de fabricación (Veiga y col., 1994; Guerrero y col., 1997).

Los vertidos líquidos de la **industria láctea** son los más abundantes entre los de la industria alimentaria (Wheatley, 1994), aunque dependen del tipo de producto y proceso y de las características de los equipos empleados (Iglesias, 1994; MMA, 1996). En la elaboración de leches líquidas se ha estimado que el consumo de agua ronda los 3-4 L de agua/Kg producto final, mientras que en la de queso y mantequilla esta relación aumenta a 25 L (MMA, 1996). Estas industrias vierten en general los líquidos de forma discontinua, siendo la composición variable en cada descarga (MMA, 1996; Strydom y col., 1997). En la Tabla 7 se muestran las principales características de los efluentes generados durante la elaboración de distintos productos lácteos.

Los efluentes lácteos están constituidos principalmente por las aguas de lavado, los agentes de limpieza y desinfección y los restos de leche y diversos materiales lácteos desechados o derramados durante los procesos productivos (López Mateos y col., 1986; Tarbox, 1993; Wendorff, 1998).

Tabla 7. Características de los efluentes generados en las industrias lácteas.

mg/L	Leche consumo (1)	Mantequilla (2)	Queso (3)	Helados (4)	Otros (5)
DQO	900-6.000	1.750-33.000	1.000-77.000	2.000-6.000	2.000-6.000
DBO₅	400-4.000	1.100-21.800	400-5.000	1.200-4.000	1.200-4.000
SS	200-1.000	498-700	200-2.500	350-1.120	220-3.000
Fósforo	4-33	10-443	15-70	20-50	6,2-50
Aceites y grasas	60-1.000	300-5.226	200-5.700	610	110-1.900
Nitrógeno Total	40-100	25-535	80-5.600	50-60	50-100
Temp. °C	18-52	28-30	21-27	-	-
pH	4,4-11	5,8-10	<4-9,5	8-11	8-11

Datos tomados de:

- (1) López Mateos y col., 1986; Anderson y col., 1994; Iglesias, 1994; MMA, 1996; Strydom y col., 1997; Espigares y col., 1997; Ince, 1998.
- (2) González y col., 1982; Iglesias, 1994; MMA, 1996; Strydom y col., 1997.
- (3) Marwaha y col., 1989; Borja y col., 1992; Iglesias, 1994; Monroy y col., 1995; MMA, 1996; Kalyuzhnyi y col., 1997; Strydom y col., 1997.
- (4) Iglesias, 1994; Monroy y col., 1994.
- (5) Rusten y col., 1993; Kasapgil y col., 1994; MMA, 1996.

En general, y con independencia de que la limpieza de los equipos e instalaciones se realice de forma manual, semiautomática o empleando sistemas CIP (limpieza *in situ*), en la industria láctea se aplican ciclos de limpieza que incluyen las siguientes etapas: pre-enjuague, tratamiento alcalino, primer enjuague intermedio, tratamiento ácido, segundo enjuague intermedio, tratamiento con desinfectantes y enjuague final (Spreer, 1991).

Como ya se indicó en el apartado 1.2. en la industria láctea los agentes de limpieza empleados son alcalinos, sobre todo, sosa y derivados (González y col., 1982; IDF, 1994, MMA 1996). La principal consecuencia del uso de este tipo de agentes es la elevación del

pH de los efluentes (Tarbox, 1993; IDF, 1994). La formación frecuente de depósitos minerales en los equipos del procesado, hace también necesario el empleo de ácidos fuertes, como el nítrico o fosfórico (IDF, 1994; MMA, 1996). Cuando la cantidad de estos ácidos en el efluente es elevada, los tratamientos biológicos posteriores pueden ser insuficientes para disminuir satisfactoriamente la concentración de fósforo y/o nitrógeno; por otra parte, la incorporación de estas aguas a los lagos y cauces naturales contribuye a la eutrofización (IDF, 1994). Por este motivo, se aconseja la limpieza con ácidos orgánicos fácilmente degradables, como el ácido cítrico o el glucónico (IDF, 1994). Para mejorar la eliminación de los restos lácteos acumulados en los equipos, a menudo los productos de limpieza incluyen agentes secuestrantes y surfactantes. Dentro del primer grupo se recomienda el uso de NTA en vez de EDTA, por su menor poder tóxico, y dentro del segundo, los compuestos aniónicos o neutros en sustitución de los catiónicos, por formar menos espumas que interfieren en los tratamientos biológicos posteriores (IDF, 1994).

Los efluentes lácteos, salvo los procedentes de procesos que incluyen la adición de cultivos iniciadores, se caracterizan por contener un nivel bajo de microorganismos (Wendorff, 1998). De ahí, que la concentración de desinfectantes empleados sea más baja que en otras industrias alimentarias (Wendorff, 1998). Los de uso más común son los derivados clorados, el H_2O_2 y el ácido paracético (IDF, 1994).

Se ha estimado que la leche y los materiales lácteos vertidos pueden suponer el 6% del total de la leche procesada, y ser responsables del 90% de la carga contaminante de los efluentes (Tarbox, 1993; Wendorff, 1998). Aunque este tipo de materia orgánica se considera fácilmente biodegradable (la relación DQO/DBO₅ oscila entre 1,4 y 2,2) y de carácter no tóxico, la presencia de algunos de los agentes de limpieza ya mencionados, así como la temperatura relativamente alta y el pH del efluente, pueden ralentizar su degradación (Tarbox, 1993; Wendorff, 1998; Madrid, 1999). En cuanto al estado del material lácteo en los efluentes, hay que señalar que la mayor parte se encuentra disuelto (lactosa, proteínas séricas) o en estado coloidal (caseínas), aunque también se encuentran sólidos en suspensión (grasas, restos de cuajada) (Wheatland, 1974). Se ha estimado que tan sólo el 15% de estos sólidos suspendidos son fácilmente sedimentables (Tarbox,

1993). Otro factor a tener en cuenta es la riqueza habitual en nitrógeno y fósforo de estos efluentes (Tabla 7) (Wendorff, 1998). Obviamente, estas características condicionan los tratamientos de depuración aplicables a este tipo de vertidos, tratados en el apartado 4.3. de esta introducción.

En la Figura 2 se indican los vertidos generados en la obtención de leches líquidas de consumo durante las distintas fases del proceso productivo. Como puede observarse, los efluentes de este tipo de industrias están constituidos fundamentalmente por la leche derramada y las aguas de lavado, es decir, se trata de aguas residuales pobres en sólidos en suspensión (Tabla 7). Son además uno de los efluentes con menor poder contaminante de la industria láctea y más bajo contenido en fósforo y nitrógeno (Tabla 7).

Por el contrario, los efluentes procedentes de la elaboración de queso (Figura 3), se caracterizan por un elevado contenido en materia orgánica, particularmente lactosa, y en sólidos en suspensión (Tabla 7). Sin lugar a dudas, el componente que más afecta a la carga orgánica y al pH de estos efluentes es el suero. Así, cuando su presencia se limita al máximo, la DQO del vertido puede reducirse de 50.000 a 2.000 mg/L (MMA, 1996). Otro componente relevante de estos efluentes es la salmuera, ya que contribuye a la elevación del nivel de cloro de las aguas (IDF, 1994; Wendorff, 1998). Por otro lado, en la elaboración de aquellos quesos en los que la cuajada se somete a un tratamiento térmico (Mozzarella) o un lavado (Cottage, Edam, Gouda), las aguas de proceso también participan notablemente en el aumento de la carga orgánica de los efluentes (Carballo, 1994).

Las aguas residuales de las industrias elaboradoras de mantequilla (Figura 4) destacan también por su alto poder contaminante y su contenido en fósforo (Tabla 7). En este caso, la mayor o menor presencia de mazada es uno de los factores que más afecta al contenido en materia orgánica del efluente. Además, las aguas de lavado de la mantequilla, ricas en lactosa, grasas y nitrógeno proteico, contribuyen también significativamente a la composición del vertido final (Spreer, 1991; González y col., 1982; MMA, 1996).

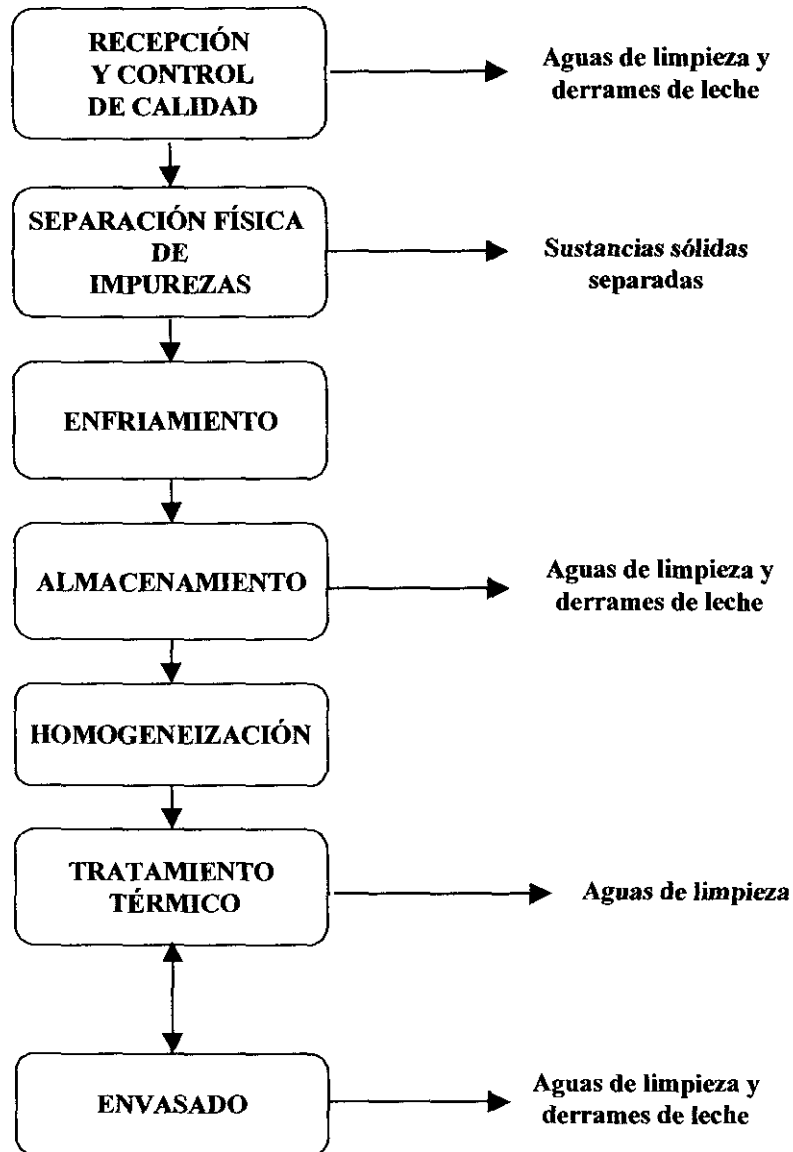


Figura 2. Vertidos generados en el proceso de producción de leches líquidas de consumo.

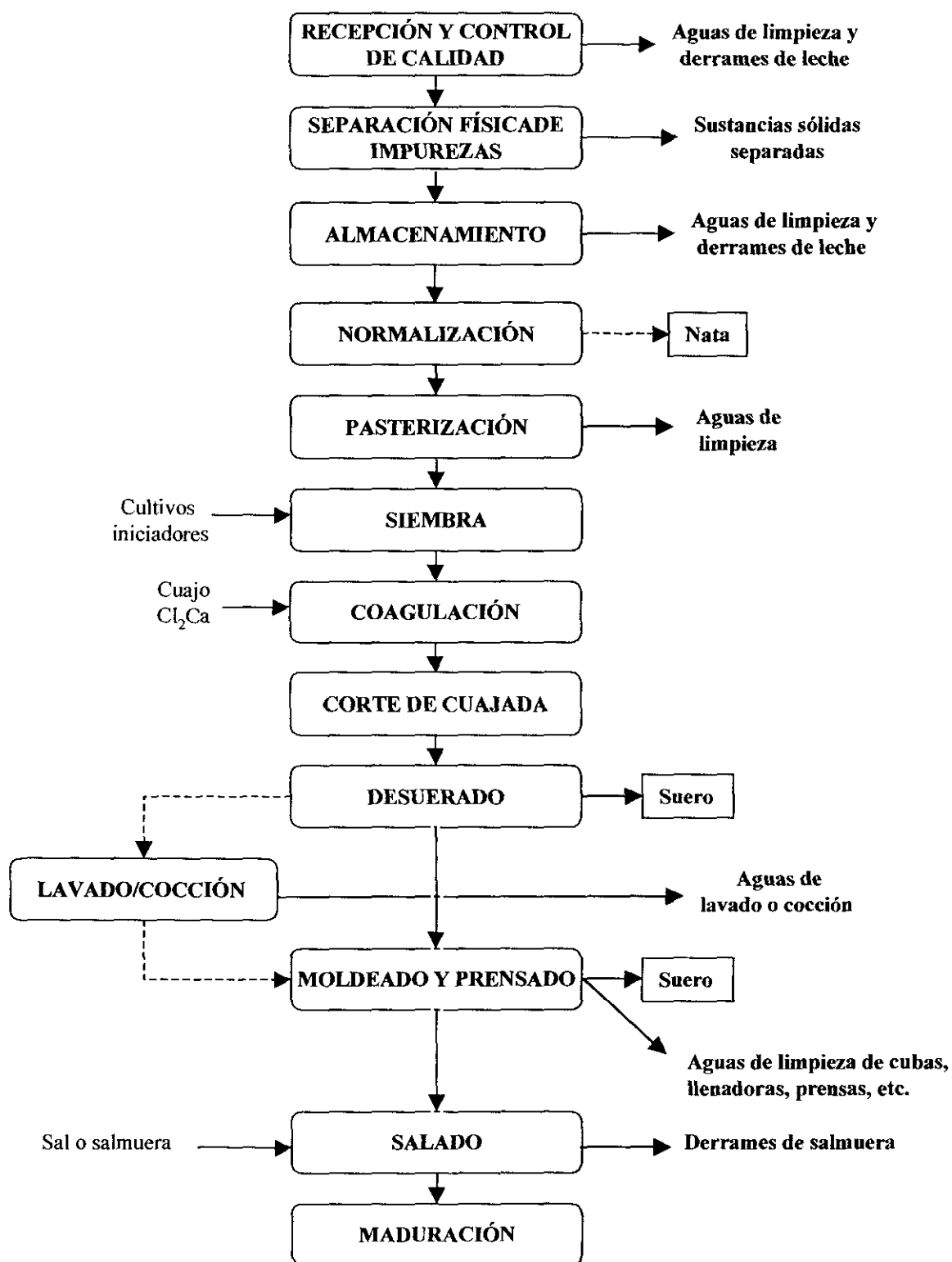


Figura 3. Vertidos generados en el proceso de producción de queso.

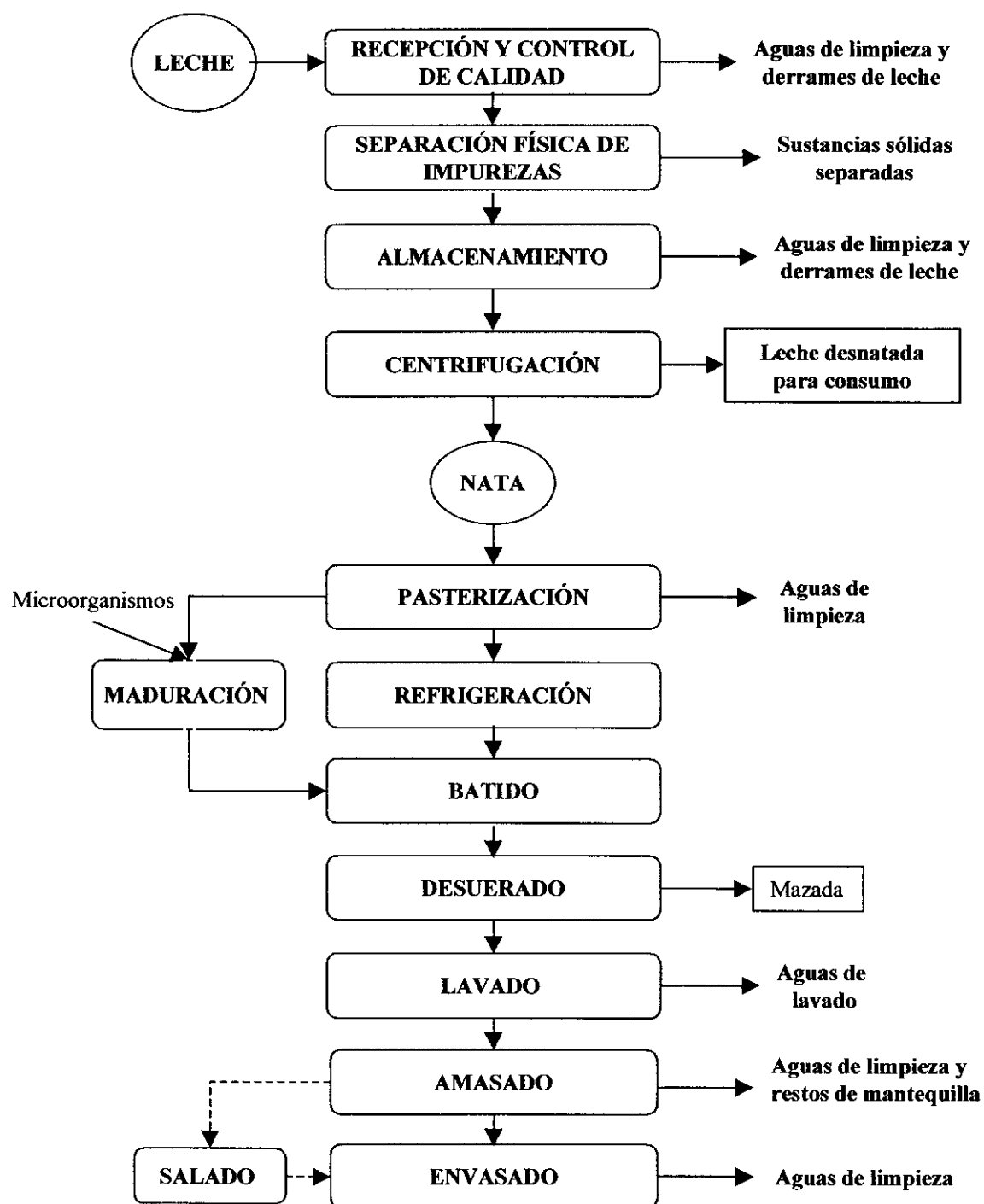


Figura 4. Vertidos generados en el proceso de producción de mantequilla.

4. TRATAMIENTO DE RESIDUOS ALIMENTARIOS

4. 1. Residuos sólidos

Dentro de los residuos sólidos de las industrias agroalimentarias, no sólo se engloban los materiales procedentes de materias primas descartados durante el procesado de los alimentos, sino también los fangos o lodos procedentes de las instalaciones depuradoras de efluentes de estas industrias.

El principal componente de estos fangos es el agua, de ahí que normalmente, para su aprovechamiento se elimine parte de ésta, pudiendo emplearse para ello distintos procedimientos (sedimentación, filtración, flotación, centrifugación), algunos de los cuales se describen con mayor detalle en el apartado 4.2.1. de esta sección. Para favorecer la eliminación del agua en los sistemas mencionados, a menudo se recurre al acondicionamiento mediante adición de agentes químicos, congelación-descongelación o por tratamientos térmicos. Con frecuencia, sin embargo, es preferible someter a los fangos, previamente concentrados, a un tratamiento aerobio o anaerobio (veanse los fundamentos en el apartado 4.2.2. de esta misma sección).

Dependiendo del tipo de fango, su destino final puede variar. Así, los procedentes de tratamientos primarios de efluentes de la industria alimentaria pueden secarse y emplearse como pienso; los residuales, tras sufrir un tratamiento biológico, pueden mezclarse con arena o paja y servir como abono. No obstante y sea cual sea el tratamiento de lodos aplicado, siempre se obtiene una cierta cantidad de residuos sólidos que hay que eliminar, junto con otros restos alimenticios, por alguno de los métodos descritos a continuación.

Los vertederos y no siempre los controlados, han sido el destino más barato y comúnmente empleado para la evacuación de los residuos sólidos procedentes de industrias alimentarias. Los riesgos sanitarios, los olores desagradables que tienen lugar debido a la putrefacción de la materia orgánica, y los humos procedentes del quemado de estas basuras, hacen inaceptables actualmente a estos sistemas. La tendencia actual es instalar vertederos controlados que permitan la recogida y el aprovechamiento del biogas producido, cuyo poder calorífico puede alcanzar las 6.000 Kcal/m³ (Carreras, 1998).

Otro destino que se ha venido dando a los residuos ha sido el enterramiento, pero también en este caso se producen olores desagradables, a la vez que se fomenta la proliferación de insectos y roedores en las zonas de enterramiento (Brennan y col., 1998). En el caso de los residuos de origen animal la normativa vigente establece que éstos deben ser incinerados o enterrados (RD 2224/1993). De realizarse el enterramiento, éste debe ser autorizado y vigilado por los órganos autonómicos competentes y realizarse “a suficiente profundidad para que los animales carnívoros no puedan acceder a los cadáveres o animales muertos y desperdicios, y en terreno adecuado para evitar la contaminación de las capas freáticas o cualquier daño al medio ambiente”. En caso necesario, estos restos deben además rociarse previamente con desinfectantes (RD 2224/93).

La cremación o incineración consiste en la aplicación de altas temperaturas (alrededor de 600°C) para reducir la materia orgánica a cenizas, que pueden eliminarse de forma segura en vertederos. No obstante, la normativa establece que para evitar la difusión de sustancias tóxicas y olores desagradables derivados de los gases y partículas generados durante la combustión, éstos deben ser sometidos a un nuevo tratamiento térmico a mayor temperatura (superior a los 850°C), en el que los componentes volátiles se oxidan y se elimina el olor (Gabás, 1998; Maillo, 1998; RD 1088/92). El tratamiento por incineración de los restos de origen animal es según algunos autores una de las alternativas más baratas y fiables (Gabás, 1998) y se ajusta al RD 1088/92. En ocasiones extraordinarias, como es el caso de la Encefalopatía Espongiforme Bovina y el Síndrome de Creutzfeldt-Jakob (Resolución de 4 de julio de 1996), las autoridades sanitarias dictan además normas adicionales para la destrucción de los residuos animales.

El compostaje es por otra parte un proceso de oxidación biológica controlada; los residuos orgánicos heterogéneos son así transformados, por acción de diversos microorganismos, en un producto final estable e inocuo que puede emplearse como fertilizante en agricultura (Masaguer, 1998).

4. 2. Residuos líquidos

Aunque los contaminantes de las aguas residuales suelen eliminarse mediante procesos que combinan procedimientos físico-químicos y biológicos, en algunos casos es posible

reducir la carga contaminante aplicando tan solo métodos físico-químicos. Tradicionalmente, en las instalaciones depuradoras se denominan *tratamientos primarios* a los de naturaleza física, particularmente sedimentación, *tratamientos secundarios* a los de tipo biológico, y *tratamientos terciarios o avanzados* a los que se aplican después de un tratamiento biológico. La elección de los procedimientos está condicionada fundamentalmente por la calidad y variabilidad del agua residual, así como por el grado de depuración perseguido.

En la actualidad existen proveedores que facilitan plantas depuradoras compactas y prefabricadas en las que se integra un número variable de operaciones unitarias que son especialmente recomendables para instalaciones de pequeño tamaño. Cuando las instalaciones son grandes, sin embargo, se suele recurrir al diseño de sistemas de depuración específicos, que pueden operar en serie o en paralelo. La utilización de unidades múltiples en los tratamientos de depuración ofrece ventajas importantes, sobre todo en las plantas grandes, ya que permiten la reparación o mantenimiento de una determinada unidad sin necesidad de detener el proceso.

Antes de tratar los procesos de depuración específicos de la industria láctea, se describen brevemente algunas de las principales operaciones unitarias empleadas, diferenciando entre tratamientos físico-químicos y biológicos.

4. 2. 1. *Tratamientos físico-químicos*

La eliminación del material más grosero mediante **rejas** o **tamices** es la primera operación que se realiza en el tratamiento de depuración de la mayoría de las aguas residuales, y se conoce como *desbaste*. Esta operación es de gran importancia ya que limita los problemas derivados de una acumulación excesiva de residuos de gran tamaño en el resto de las instalaciones.

Las rejas suelen estar constituidas por varillas o barras paralelas metálicas. Estos elementos separadores suelen disponerse en vertical o con una ligera inclinación, pudiendo ser fijos o móviles. Se utilizan rejas fijas cuando la cantidad de sólidos del agua residual no es excesiva, ya que su sistema de limpieza es manual. Por el contrario, cuando

la acumulación de sólidos es muy abundante se suelen emplear rejas móviles a modo de cinta sinfín, lo que permite su limpieza mecánica.

Los tamices suelen estar constituidos por placas perforadas o mallas metálicas, dispuestos en vertical o inclinados, fijos o móviles, con forma plana o como tambores rotatorios. También pueden emplearse tamices en otras fases del proceso de depuración, por ejemplo después de la sedimentación de las aguas procedentes de un tratamiento biológico; en estos casos sin embargo, las mallas utilizadas tienen un tamaño de exclusión menor.

El agua a tratar debe mantener unas condiciones, en cuanto a su composición y caudal, más o menos constantes en el tiempo, para ser depurada eficazmente. Por ello, con frecuencia se recurre al **equilibrado u homogeneización** de los efluentes en depósitos que faciliten el mezclado. La homogeneización puede aplicarse a todo el caudal de agua (en serie) o tan solo a los excedentes (en paralelo). Frecuentemente se realiza un equilibrado después del tratamiento primario, para homogenizar los efluentes que van a ser sometidos a tratamientos biológicos.

La **sedimentación**, o separación de las partículas sólidas suspendidas por acción de la gravedad, es una de las operaciones más frecuentemente implantadas en las instalaciones depuradoras, por su bajo coste económico. Puede servir para eliminar y sustituir total o parcialmente a los tratamientos biológicos, de mucho mayor coste. Es un sistema de separación muy versátil que puede aplicarse como tratamiento preliminar (*clarificadores primarios*) o final (*clarificadores secundarios*) de los tratamientos biológicos; además, puede utilizarse para aumentar el grado de compactación de los fangos biológicos.

La velocidad de sedimentación depende de las características físico-químicas de las partículas y del fluido, y de la concentración de sólidos presentes en el medio. Aunque se pueden distinguir 4 tipos de sedimentación, según la concentración y grado de interacción entre partículas, a menudo, estos mecanismos tienen lugar de forma simultánea. La sedimentación de tipo I o de partículas discretas, tiene lugar cuando éstas sedimentan independientemente, sin interaccionar unas con otras. Sin embargo, en la sedimentación

de tipo II o floculante las partículas vecinas interaccionan, bien de forma natural, o inducida por la adición de sustancias químicas, formando agregados que sedimentan a mayor velocidad. El tipo III o zonal suele ser característico de suspensiones de concentración intermedia. En este caso, las partículas interaccionan entre sí con fuerza suficiente como para limitar la movilidad individual de cada una, de forma que la decantación tiene lugar en masa, apareciendo fases o zonas intermedias entre el líquido clarificado y el material sedimentado. La sedimentación de tipo IV, o por compresión, se obtiene gracias al peso ejercido por las partículas de capas superiores sobre las capas inferiores de la suspensión. La compactación de los fangos biológicos, que pueden alcanzar gran voluminosidad, por ejemplo es necesaria para su eliminación.

Los *clarificadores convencionales* son tanques circulares de fondo inclinado, a los que suele acoplarse un sistema de rascadores para la eliminación del material sedimentado (Figura 5 a). Su alimentación suele ser de flujo ascendente, aunque con una velocidad inferior a la de sedimentación de la partícula más lenta, para evitar su arrastre.

Para limitar dicho arrastre, se diseñaron originalmente los denominados *clarificadores lamelares, de placas o tubulares*. En este tipo de decantadores se aloja un paquete de láminas o tubos de diversos materiales, dispuestos con distintos grados de inclinación. Cuando el flujo es ascendente, el material en suspensión sedimenta por gravedad y a contracorriente sobre la superficie de los tubos o lamelas. La inclinación de estos elementos condiciona el sistema de limpieza empleado.

Los *desarenadores* son tanques de sedimentación concebidos para la eliminación de arena, grava y otros materiales pesados, inorgánicos u orgánicos no fácilmente biodegradables (huesos, granos de café, cáscaras de huevo), con tamaño de partícula generalmente superior a los 0,2 mm, sirven para proteger de la abrasión a los componentes mecánicos, evitar los depósitos en las conducciones y reducir el trabajo de limpieza de los digestores. Estos equipos suelen localizarse al principio de las instalaciones depuradoras, precediendo o siguiendo a los sistemas de rejillas o tamices. Dado que el material separado no se suele someter a ningún otro tratamiento de depuración, es importante minimizar las pérdidas de componentes orgánicos biodegradables durante esta operación.

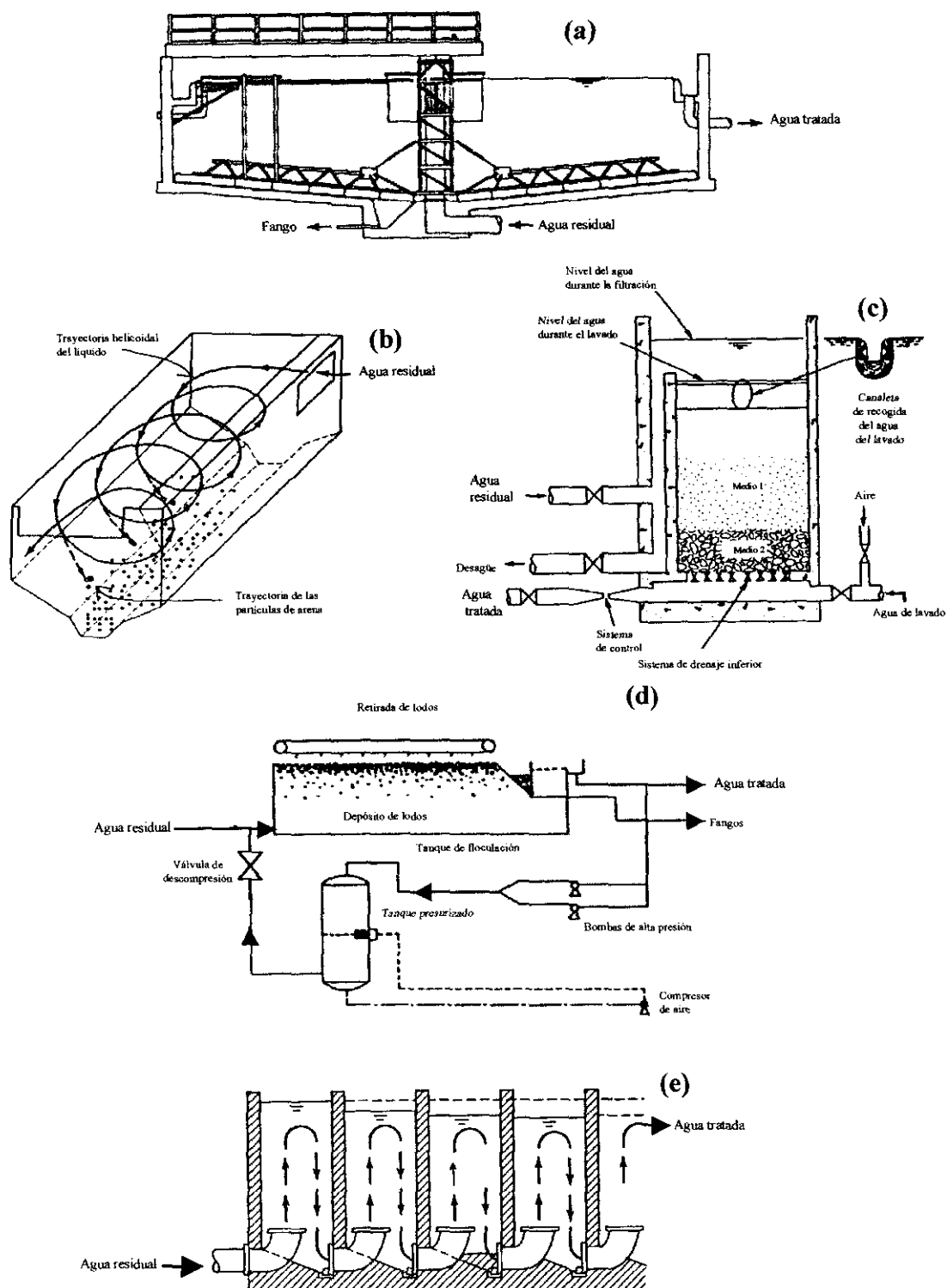


Figura 5. Esquemas de funcionamiento de diversos equipos y sistemas empleados en el tratamiento físico-químico de las aguas residuales. (a) Decantador convencional; (b) Desarenador; (c) Filtro de medio múltiple de flujo descendente por gravedad; (d) Sistema de flotación por aire disuelto; (e) Floculador tipo Alabama. Tomado de: Droste (1997); Metcalf y Eddy (1998); Paterson y Cooke (1998).

Los desarenadores más frecuentes son los de flujo horizontal, los aireados y los de vórtice. Los primeros son canales abiertos, cuya longitud y velocidad de flujo permiten la sedimentación del material de tipo arenoso, pero no la de las partículas orgánicas. Los desarenadores aireados tienen un flujo en espiral, impulsado por aire, de forma que las partículas orgánicas se mantienen en suspensión (Figura 5 b). Los de vórtice tienen forma cilíndrica; su flujo de entrada es tangencial y crea una corriente en vórtice, en el que las arenas se separan por las fuerzas centrífuga y gravitatoria.

La **filtración** permite eliminar de las aguas residuales partículas finas sólidas pero no sedimentables, coloides finos, protozoos y algas, así como reducir el contenido de otros microorganismos de menor tamaño (bacterias, levaduras y mohos). Esta operación suele realizarse para eliminar el material sólido no descartado durante la sedimentación, para eliminar la turbidez de los efluentes procedentes de los clarificadores acoplados a tratamientos biológicos, para eliminar las algas de los efluentes de las lagunas de estabilización, y como tratamiento preliminar de las aguas residuales con un elevado contenido en sólidos en suspensión.

En las plantas depuradoras, a diferencia de algunas industrias como la alimentaria, el flujo del líquido filtrado se impulsa por gravedad, operándose tan solo a presiones mayores que la atmosférica (filtración a presión) en algunas pequeñas instalaciones. Los filtros empleados pueden ser de flujo ascendente, descendente o de biflujo, siendo los de flujo descendente los más ampliamente utilizados.

Atendiendo al tipo de lecho filtrante, se pueden distinguir los de medio único (fundamentalmente arena) y los constituidos por dos o más tipos de medios (arena, antracita, carbón activo, etc.). Los equipos de *lecho de medio único* más frecuentes son los de tamaño de poro uniforme. Hay también lechos de medios estratificados, de forma que las partículas más gruesas del medio se acumulan en el fondo y las más finas en la parte superior.

En los filtros de *lechos múltiples*, sin embargo, la limpieza se lleva a cabo haciendo pasar agua sola o combinada con aire a contracorriente a una velocidad suficiente para expandir el medio; la liberación del material acumulado en estos lechos, no sólo se

produce como consecuencia de la fuerza hidráulica ejercida, sino también por el rozamiento entre partículas. En la Figura 5 c se muestra el esquema del funcionamiento de filtros de medio múltiple de flujo descendente por gravedad.

La **separación por membranas** permite descartar el material disuelto o coloidal del agua, en función de su tamaño molecular. Esta operación es particularmente adecuada para el tratamiento de las aguas residuales industriales, a partir de las cuales se quiere recuperar o reciclar algún componente específico. Los procesos de membrana conducidos a presión, tienen diferente denominación según el tamaño de poro empleado; de mayor a menor tamaño de poro y de moléculas excluidas, están la microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. Algunos ejemplos de la aplicación de estos sistemas son la recuperación de metales, de lignina (en efluentes de la industria papelera), de lactosa (en efluentes de la industria láctea), de sales (para la desalinización de agua de mar), etc. Los procesos basados en la separación electroquímica, como electrodiálisis, combinados o no con el uso de membranas, también están experimentando un gran desarrollo en los últimos años.

La **flotación** se utiliza para separar partículas sólidas o líquidas de los efluentes, y se basa en la capacidad de las partículas para ascender a la superficie del líquido por diferencia de densidad, se utiliza para separar grasas por ejemplo. Para separar partículas de densidad mayor que el agua que las contiene, se suelen insuflar burbujas de gas, generalmente de aire, en el líquido. Las burbujas de gas formadas penetran en los flóculos o se adhieren a las partículas, y el conjunto sube a la superficie. Este procedimiento se emplea para eliminar de los efluentes sólidos suspendidos y para concentrar algunos fangos biológicos o químicos.

Según el sistema empleado en la formación de burbujas de aire se distinguen tres tipos de flotación: por aire, por aire disuelto a presión y por vacío. En la flotación *por aire*, la aireación se lleva a cabo a presión atmosférica. Sin embargo, en la flotación *por aire disuelto* la inyección de aire se realiza a varias atmósferas de presión, manteniéndose el líquido durante unos minutos en un tanque presurizado; a continuación, se le hace pasar por una válvula de decompresión antes de acceder al tanque de flotación, en cuya atmósfera se aplica un vacío parcial, y el aire se desprende en forma de finas burbujas e

impulsa hacia arriba las espumas (Figura 5 d). Normalmente, los equipos de flotación, además de tener dispositivos barredores del material flotante, poseen sistemas para recoger los fangos depositados en el fondo del tanque.

La **coagulación** consiste en la adición de compuestos químicos para atrapar o desestabilizar las partículas coloidales, de forma que se favorezca su aglomeración o floculación y precipitación. Este procedimiento permite eliminar específicamente determinados componentes del agua residual; este es el caso de la adición de sulfato de aluminio a los efluentes de un tratamiento biológico aerobio para la eliminación del fósforo. Los coagulantes químicos más empleados son sales de aluminio, de hierro, o de sílice, cal y polímeros orgánicos, sintéticos (poliacrilamidas, polietileniminas y polivinilaminas) o naturales (quitosano, alginatos, derivados del almidón y de la celulosa, etc.). Los agentes añadidos deben dispersarse en el agua residual lo más rápidamente posible, para lo que se pueden emplear mezcladores mecánicos, neumáticos o hidráulicos.

La **floculación** persigue, mediante un mezclado suave, promover el contacto entre partículas para fomentar la formación de flóculos o agregados. Esta operación puede realizarse en tanques independientes o en equipos donde se combinan otros tratamientos, con coagulación o sedimentación por ejemplo. Existen distintos tipos de floculadores según el sistema de agitación empleado, siendo algunos de los más representativos los denominados *floculadores de paletas* (mecánicos) y los de tipo *Alabama* (hidráulicos). Estos últimos están constituidos por una cámara rectangular tabicada, en cada una de cuyas secciones el flujo de agua sigue una trayectoria ascendente y luego descendente, recogiendo en varias fases los flóculos antes de completarse la clarificación, como se muestra en la Figura 5 e.

4. 2. 2. Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos de depuración aprovechan la actividad metabólica de muy diversos microorganismos, para transformar la materia orgánica biodegradable en materia orgánica más estable (biomasa de organismos unicelulares) y gases. Estos fenómenos están basados en la aplicación controlada de los principios de autodepuración

La eliminación de la carga orgánica de las aguas residuales dependerá pues, fundamentalmente, de la disponibilidad de oxígeno y de la actividad de la biomasa.

Entre los microorganismos que participan en los procesos de depuración aerobia, son predominantes las bacterias heterótrofas (*Pseudomonas*, *Zooglea*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*) que pueden llegar a representar hasta el 95% de la flora total (Bitton, 1994; Droste, 1997). Otras bacterias que también colaboran en estos procesos son las nitrificantes (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*) y las filamentosas (*Nocardia*, *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Leucothrix*, *Haliscomenobacter*, además de los llamados Tipo 021N y Tipo 1701 de la clasificación de Eikelboom y van Buijsen, 1981) (Bitton, 1994; Metcalf y Eddy, 1998). Aunque con un papel menos destacado, otros tipos de organismos (virus, hongos, protozoos y rotíferos) contribuyen también a la utilización de la materia orgánica. Los hongos no suelen abundar en los tratamientos aerobios, pero, cuando alcanzan un nivel alto actúan negativamente sobre la decantación de los fangos. Además, pueden participar, junto con las bacterias filamentosas y las productoras de grandes cantidades de exopolisacáridos (*Zooglea*), en el fenómeno denominado del *bulking* o abultamiento (formación de fangos muy voluminosos y de difícil sedimentación) (Bitton, 1994; Droste, 1997). La ausencia en los fangos aerobios de protozoos y rotíferos, predadores normales de bacterias, es uno de los indicadores de deficiencias en los tratamientos aerobios (Bitton, 1994).

Aunque los requerimientos de oxígeno no suelen ser elevados (del orden de 2 mg/L) (Metcalf y Eddy, 1998; Droste, 1997), es imprescindible que su distribución en el medio sea lo más rápida y homogénea posible. El aporte de oxígeno suele realizarse mediante distintos sistemas de aireación, siendo los más frecuentes los de difusión y los mecánicos. En los primeros, el difusor se suele situar en el fondo del reactor y el aire suministrado asciende en forma de burbujas. El número y el tamaño de las burbujas liberadas condicionan la velocidad de la transferencia gaseosa, que es mayor cuanto menor es el tamaño de las burbujas. En función del tamaño de burbuja deseado, se dispone de distintos modelos de difusores, como los tubulares, de placa, o de domo, entre otros. En ocasiones se utilizan aireadores mecánicos (normalmente turbinas) que pueden disponerse superficialmente o sumergidos. Mientras que en los superficiales el aire proviene de la

atmósfera, en los sumergidos, el aire introducido procede de la atmósfera y de la inyección en el fondo del tanque.

Dependiendo de que la biomasa se encuentre en suspensión o asociada a distintos soportes, se distingue entre tratamientos con fangos activados y de película fija, respectivamente.

El tratamiento de las aguas residuales mediante el proceso *convencional de fangos activados* se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, el efluente pasa a un reactor aireado, donde se encuentran los microorganismos en suspensión y tiene lugar la conversión de la materia orgánica. Estos reactores suelen ser tanques abiertos, más o menos profundos según el sistema de aireación empleado. Transcurrido un cierto tiempo de residencia (entre 4 y 8 horas), la biomasa se encuentra en estos tanques en forma de flóculos, como consecuencia de las interacciones intercelulares y de la producción de exopolisacáridos, que actúan como material cohesivo. La segunda etapa del proceso consiste en separar los flóculos del medio líquido, lo que se realiza en el decantador secundario. Parte de la biomasa sedimentada se introduce de nuevo en el reactor, para mantener una concentración más o menos constante de microorganismos y el resto se purga del sistema.

A lo largo de los años, el desarrollo tecnológico ha permitido mejorar los rendimientos y disminuir los costes del proceso convencional de fangos activados (Figura 6 a). Entre las numerosas modificaciones que se han propuesto, indicaremos tan solo, a continuación aquellas que han encontrado mayor aplicación en la industria láctea:

El *sistema de aireación prolongada* es adecuado para el tratamiento de aguas residuales de baja carga orgánica y difiere del convencional en que el agua no suele someterse a decantación primaria y en que los tiempos de residencia son superiores (alrededor de 30 h).

El *reactor discontinuo secuencial (SBR)* es un mismo reactor que se emplea secuencialmente como tanque de llenado, mezclador (en condiciones aerobias o anaerobias, según el caso), reactor de aireación y decantador secundario. Al completarse el ciclo, se evacua el agua tratada y se purga el fango. Así pues, los SBR no necesitan de

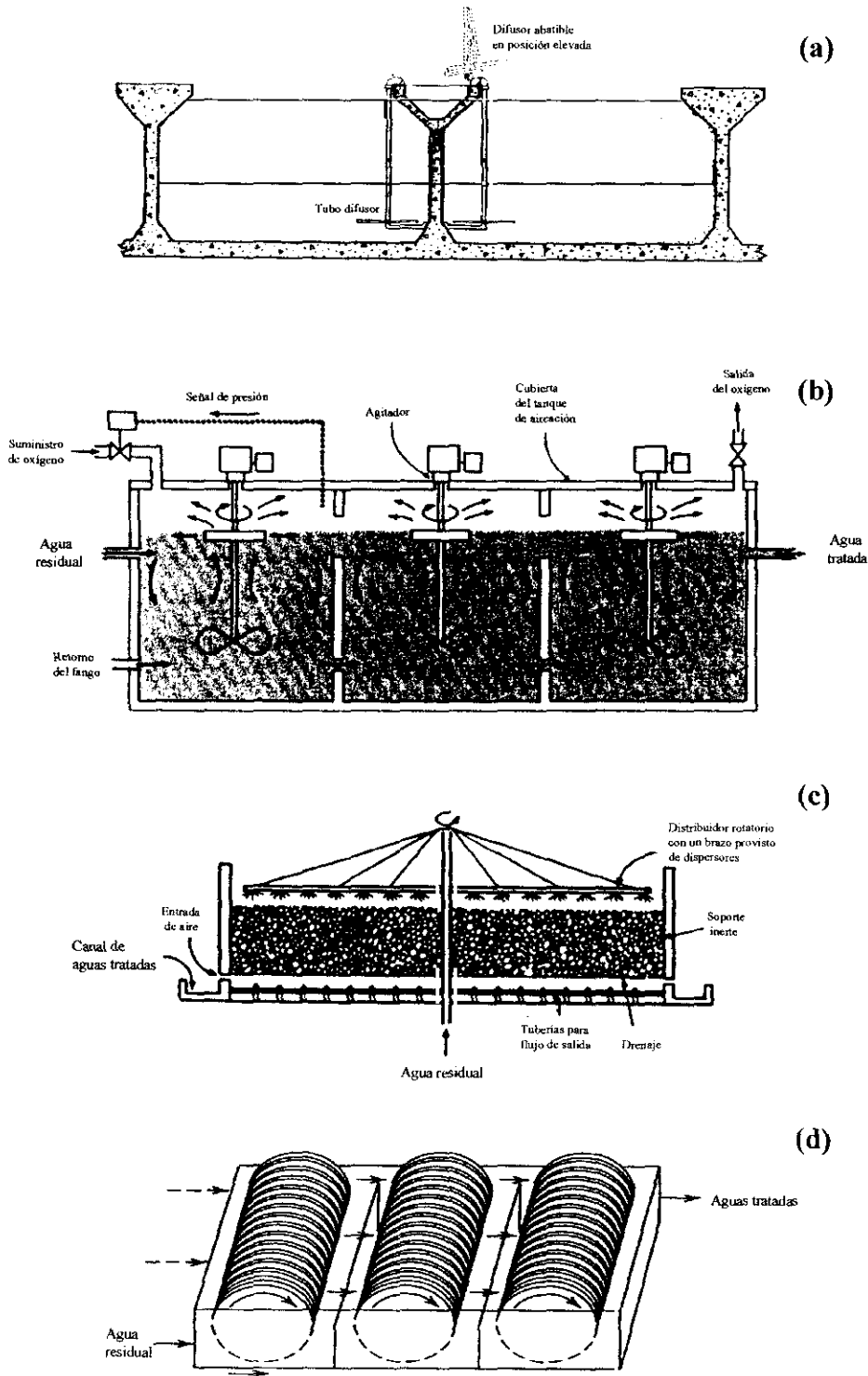


Figura 6. Esquemas de funcionamiento de distintos reactores empleados en el tratamiento aerobio de aguas residuales. (a) Fangos activados con difusor de burbujas finas convencional; (b) Sistema de oxígeno puro; (c) Filtro percolador; (d) Biodisco. Tomado de: Hough (1990); Droste (1997); Metcalf y Eddy (1998).

un sistema de retorno de fangos activados. Normalmente y para compensar la discontinuidad del proceso, las plantas depuradoras disponen de más de un reactor, de forma que mientras uno se está llenando, los otros se encuentran en otras fases del ciclo. Los SRB son adecuados para el tratamiento de aguas residuales cuya composición orgánica fluctúe notablemente.

El *proceso de contacto y estabilización* se basa en que la biodegradación de la materia orgánica tiene dos fases: una de incorporación de la materia orgánica por parte de los fangos activados y otra de asimilación metabólica. Ambas fases tienen lugar en un mismo reactor en el sistema convencional, pero en este proceso se llevan a cabo en reactores independientes. El agua residual contacta durante 20-40 minutos con los fangos activados de retorno (tanque de contacto) y a continuación, éstos se separan por decantación y se airean durante 3-6 h (tanque de estabilización), para oxidar la materia orgánica incorporada, antes de devolverse al tanque de contacto.

El *sistema de oxígeno puro* emplea este gas en vez de aire y se basa en que la velocidad específica de transferencia de oxígeno es mayor para el oxígeno puro que para el atmosférico. Este tratamiento se realiza en tanques de aireación de menor tamaño, cubiertos y divididos a menudo internamente en secciones para permitir mayor superficie y tiempo de contacto con el oxígeno (Figura 6 b). Con este sistema se consigue mejorar los rendimientos y reducir la cantidad de fangos producidos, estando especialmente indicado para el tratamiento de aguas con un contenido elevado en materia orgánica.

El *canal de oxidación* es un canal circular u ovalado, en el que el agua se airea mecánicamente durante tiempos prolongados, cuyo uso normalmente se acompaña de tanques de sedimentación secundaria para eliminar los fangos.

Aunque las lagunas o estanques de estabilización pueden diseñarse para mantener distintas condiciones de oxigenación, aquí tan solo se mencionan algunas características de las aerobias. El proceso de *lagunas aireadas* es muy similar al de fangos activados, manteniéndose en suspensión la totalidad de los sólidos. La principal diferencia estriba en que en este caso se usa como reactor un depósito excavado en el suelo. Para oxigenar el agua se pueden emplear los sistemas anteriormente descritos. En la actualidad, el

tratamiento en lagunas aireadas se suele completar con decantación y recirculación de los fangos.

En los **procesos aerobios de película fija**, los microorganismos se adhieren a un medio sólido, donde alcanzan altos niveles de crecimiento. La velocidad de la formación de películas depende, fundamentalmente, de la velocidad de flujo y las características nutrientes del agua residual. Los procesos de película fija favorecen el desarrollo de microorganismos con bajas velocidades de crecimiento, son menos dependientes de las fluctuaciones del caudal y suelen emplear reactores de menor tamaño. Los procesos de filtros percoladores y los de discos biológicos rotativos de contacto (biodiscos) son los de película fija más comúnmente empleados.

El diseño de un reactor de *filtro percolador* recuerda al de un filtro, pero la filtración no participa significativamente en su mecanismo de eliminación de la materia orgánica (Figura 6 c). En este sistema, la microbiota responsable de la depuración se encuentra adherida a las partículas de relleno del reactor (grava, piedras, arena, partículas de plástico o de carbón activado) formando películas. Generalmente, el agua residual se rocía de forma uniforme sobre el lecho con un distribuidor rotativo, y el agua tratada, junto con los sólidos de tipo biológico desprendidos, se recoge mediante un sistema de desagüe situado en la parte inferior del filtro percolador. A diferencia de otros procesos aerobios, la aireación en los filtros percoladores no suele ser forzada, sino que tiene lugar por las corrientes naturales de convección que se originan como consecuencia de la diferencia de temperatura existente entre la atmósfera y el agua residual. A medida que las películas aumentan de espesor, la materia orgánica y el oxígeno difunden más lentamente a los microorganismos de las capas más próximas a la superficie de adhesión, lo que puede llegar a provocar el desprendimiento de la película. Este desprendimiento puede hacer necesaria la decantación de las aguas tratadas. Por ello, cuando la carga contaminante del efluente es intermedia o alta, pueden diseñarse procesos con más de una unidad de filtros percoladores, decantadores y recirculadores de fangos, intercalados en distintas fases del proceso.

Los *discos biológicos rotativos de contacto* suelen ser de poliestireno o cloruro de polivinilo, están suspendidos verticalmente, y giran a baja velocidad (1-2 rpm) (Figura 6

d). Los discos se encuentran parcialmente sumergidos en el agua residual, de forma que al girar, la biomasa adherida contacta alternativamente con el líquido a tratar y con el oxígeno atmosférico. Las películas desprendidas y arrastradas por el agua se eliminan posteriormente por decantación.

La utilización en serie de algunos de los procesos aerobios anteriormente descritos, se ha empleado con éxito para depurar aguas residuales urbanas e industriales, siendo frecuente la combinación de filtros percoladores y fangos activados. En estos casos, el primer paso actúa como pretratamiento para reducir la carga orgánica, mejorando el rendimiento del segundo.

4. 2. 2. 2. Tratamientos anaerobios

Inicialmente este tipo de tratamientos se aplicaban para estabilizar los fangos procedentes de las distintas fases del proceso de depuración. Posteriormente, sin embargo, se han convertido en procedimientos cada vez más frecuentes para la depuración de aguas residuales. Una característica muy ventajosa de estos tratamientos biológicos es que la cantidad de biomasa formada es del orden de 10 veces inferior a la procedente de un tratamiento aerobio (Bitton, 1994). En los tratamientos anaerobios, la correspondiente microbiota convierte, en ausencia de oxígeno, la materia orgánica (disuelta o en suspensión) en biomasa, y distintas proporciones de gases (metano, hidrógeno, amoníaco y dióxido de carbono). El metano tiene un alto poder calorífico y puede emplearse como fuente de energía en la propia planta depuradora; este beneficio compensa el coste originado, sobre todo en climas fríos, por la necesidad de mantener temperaturas relativamente altas durante el proceso de biodegradación.

Esta forma de conversión de la materia orgánica es debida a la actuación combinada de un grupo bastante específico de bacterias anaerobias, facultativas y estrictas. El proceso tiene lugar en varias etapas. Primero se hidrolizan los compuestos de gran tamaño, dando lugar a otros fácilmente asimilables. La capacidad de estos microorganismos para degradar sólidos orgánicos en suspensión, hace que la decantación primaria no sea en este caso una operación tan crítica como en los tratamientos aerobios. Seguidamente, los

compuestos fácilmente asimilables se transforman en ácidos orgánicos simples (principalmente acético, butírico y propiónico), alcoholes, dióxido de carbono e hidrógeno. Por último, se produce metano, dióxido de carbono, y pequeñas cantidades de hidrógeno, nitrógeno y ácido sulfídrico (Bryant, 1979; Vallés y col., 1980; Metcalf y Eddy, 1998; Droste, 1997). Algunos autores han agrupado estos procesos en 3 fases (Acidogénica, Acetogénica y Metanogénica) (Bryant, 1979; Vallés y col., 1980; Droste, 1997), mientras que otros agrupan las 2 primeras (fase acidogénica-acetogénica) (Horton, 1987; Metcalf y Eddy, 1998; Urcelay, 1998). En la Tabla 8 se divide el conjunto en 2 fases y se muestran las transformaciones y grupos bacterianos implicados en la digestión anaerobia, así como los sustratos característicos y los productos de reacción.

Tabla 8. Grupos bacterianos implicados en la digestión anaerobia de efluentes.

Fase	Acción	Grupo bacteriano	Productos iniciales	Productos finales
ACIDOGÉNICA/ACETOGENICA	<i>Hidrolítica</i>	Bacterias hidrolíticas	Lípidos Proteínas Carbohidratos	Ácidos orgánicos Alcoholes CO ₂ H ₂
	<i>Fermentativa</i>	Bacterias Fermentativas acidogénicas	Glucosa Aminoácidos Ácidos grasos	Ácido acético
	<i>Acetogénica</i>	Homoacetogénicas	Ácidos orgánicos Alcoholes Carbohidratos CO ₂ H ₂	Ácido acético
		Acetogénicas productoras de H ₂	Ácidos orgánicos Alcoholes	Ácido acético H ₂
METANOGENICA	<i>Metanogénica</i>	Hidrógenotróficas	H ₂ CO ₂	CH ₄ H ₂ O
		Acetotróficas	Ácido acético	CH ₄ CO ₂

En la primera fase de la digestión participan bacterias anaerobias, facultativas o estrictas, de los géneros *Clostridium* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Actinomyces* sp., *Desulphovibrio* sp., y *Escherichia coli*, además de otras bacterias productoras de enzimas proteolíticas, lipolíticas, ureolíticas y celulolíticas (Bitton, 1994; Metcalf y Eddy, 1998). Las bacterias metanogénicas, sin embargo, son microorganismos anaerobios obligados, e incluyen especies de los géneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanococcus*, *Methanosaeta* y *Methanosarcina*, que producen alrededor del 70% del total del metano descarboxilando el ácido acético (Bryant, 1979; Vallés y col., 1980; Bitton, 1994; Metcalf y Eddy, 1998; Droste, 1997). Este último grupo de bacterias se caracteriza por estar constituido por un pequeño número de especies, que son muy sensibles a las condiciones ambientales y de crecimiento muy lento, por lo que su metabolismo es el paso limitante del proceso.

Las bacterias metanogénicas son extremadamente sensibles a las variaciones de temperatura, existiendo 2 intervalos óptimos, mesófilo (20-40°C) y termófilo (40-60°C), que determinan 2 tipos distintos de digestión anaerobia. La digestión termofílica necesita tiempos de retención hidráulica más cortos, inferiores a 15 días, mientras que los tiempos típicos de la mesofílica son de unos 30 días (Vallés y col., 1980; Metcalf y Eddy, 1998; Urcelay, 1998). Como contrapartida, la digestión termofílica conlleva un coste energético superior y un control muy estricto de los cambios de temperatura, porque estas bacterias de este intervalo son hipersensibles a las oscilaciones térmicas (Vallés y col., 1980; Urcelay, 1998). También se puede obtener metanogénesis en una banda de temperatura psicrófila (10-20°C), pero el rendimiento energético es muy bajo (Droste, 1997; Urcelay, 1998).

Otro parámetro que las bacterias metanogénicas exigen controlar es el pH, que óptimamente no debería desviarse del intervalo 6-8 (Vallés y col., 1980; Droste, 1997; Urcelay, 1998). Una acidificación excesiva puede ocurrir por ejemplo por un aumento de la producción de ácidos volátiles, por parte de la flora acidogénica, cuyo pH óptimo está entre 5,5 y 6,5 (Vallés y col., 1980).

En el influente pueden existir componentes tóxicos o inhibidores, desfavorables para el crecimiento de la flora metanogénica; éste es el caso de algunos metales pesados, detergentes y concentraciones altas de Na, K, Ca o Mg (Urcelay, 1998). No obstante, y sin lugar a dudas, el principal elemento inhibidor es el oxígeno (Vallés y col., 1980). Su efecto se evita utilizando reactores sellados, para impedir la entrada de aire. Esto también sirve para limitar la difusión de olores desagradables a los alrededores de la planta depuradora.

La necesidad de un control estricto de estos parámetros, junto con la peligrosidad de los gases producidos (material inflamable), hacen que la mano de obra empleada en las instalaciones anaerobias deba ser más especializada, y por tanto, más cara que la de las aerobias (Sierra y Peñalver, 1989; IDF, 1990; Droste, 1997).

Las interacciones entre los microorganismos que participan en la depuración anaerobia son tan críticas que algunos autores (Zoetemeyer y col., 1982; Droste, 1997) recomiendan la separación física de la fase acidogénica y la metanogénica. Este sistema, conocido como *tratamiento anaeróbico en dos fases*, consigue mejorar la actividad de cada grupo microbiano, y así, favorecer tanto la producción de metano como la disminución de la carga contaminante del agua residual. Por otro lado, la utilización de distintos cultivos iniciadores para el tratamiento de aguas residuales específicas, supone una alternativa interesante, que palia los problemas derivados de la variabilidad de la microbiota que trae el influente (Chartrain y col., 1987).

En los tratamientos anaerobios, al igual que en los aerobios, se utilizan procesos con la biomasa en suspensión o en película fija, pero también hay reactores de un tercer tipo (híbridos), en los que se combinan los dos tipos de procedimiento anteriormente citados.

Los procesos a base de crecimiento **en suspensión** están concebidos principalmente para la digestión de fangos procedentes de tratamientos aerobios, pero pueden también aplicarse a aguas residuales con un elevado contenido en sólidos orgánicos. Los más comúnmente empleados son el tratamiento anaerobio *convencional* y el *proceso de contacto*. Ambos procesos se llevan a cabo en digestores de mezcla cerrados. En el proceso convencional, los fangos no se recirculan y, normalmente, la digestión y la

separación de los fangos tienen lugar en el mismo reactor (Figura 7 a); sin embargo, también es posible emplear dos o más reactores en serie para separar ambas fases. Por el contrario, en el proceso de contacto, los fangos digeridos se separan en un decantador o unidad de flotación, y se emplean como inóculo del influente (Figura 7 b).

Los reactores de **película fija** más utilizados son los de lecho compacto y flujo ascendente (Figura 7 c), y los de lecho fluidificado o expandido (Figura 7 d). En los de *lecho compacto*, los microorganismos se adhieren a superficies grandes, de distintos materiales y formas geométricas, dispuestas de forma compacta y fija en el interior del reactor. Sin embargo, en los reactores de *lecho fluidificado*, la microbiota forma biofilms alrededor de pequeñas partículas móviles, granos de arena por ejemplo. En estos sistemas, las partículas del lecho se mantienen en movimiento en el interior del reactor por el flujo ascendente del influente; una vez finalizado el proceso, un dispositivo separador retiene a las partículas del lecho para su recirculación. El uso de mayor superficie útil aumenta el rendimiento de la biodegradación.

Entre los reactores **híbridos** destacan los de *manto de fango anaerobio de flujo ascendente (UASB)* (Figura 7 e), en los que la biomasa forma gránulos de tamaño similar al de un guisante. El mecanismo de agregación implicado en la formación de estos gránulos no se conoce con exactitud. El influente entra por el fondo del reactor, donde se encuentran concentrados los gránulos. Como consecuencia del gas generado durante la bioconversión, parte de los gránulos son arrastrados y se encuentran en suspensión en el líquido. Colocando en el tanque una válvula que permita la salida del gas, pero no la de los gránulos, éstos pueden sedimentar y volver a formar parte del lecho, evitándose la necesidad de dispositivos para la recirculación de fangos. Este proceso es, sin duda, uno de los sistemas anaerobios más rápidos, permitiendo conseguir tiempos de retención inferiores a 1 día.

Basados en los UASB convencionales, se han diseñado los reactores *UASB de lecho fluidificado*, en los que se ha aumentado la velocidad de flujo para conseguir una mayor dispersión de los gránulos. Este tipo de reactores parecen especialmente adecuados para el tratamiento de aguas de baja carga a bajas temperaturas.

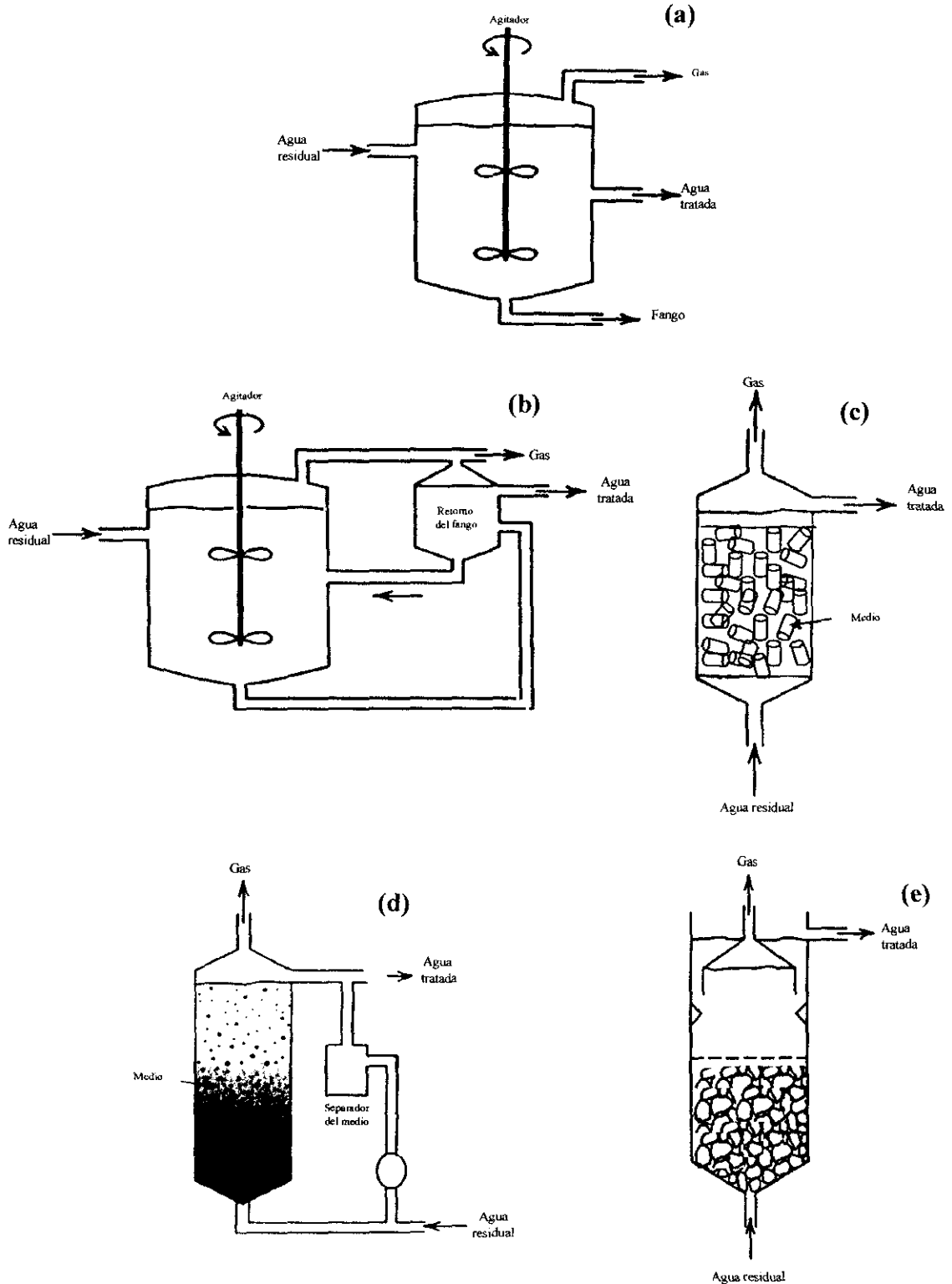


Figura 7. Esquema de funcionamiento de distintos reactores empleados en el tratamiento anaerobio de aguas residuales. (a) Convencional; (b) De contacto; (c) De flujo ascendente; (d) Lecho fluidificado; (e) UASB. Tomado de: Droste (1997).

Finalmente, hay que mencionar que los tratamientos anaerobios también pueden realizarse en *lagunas o estanques* muy profundos (hasta 6 metros) excavados en el suelo e impermeabilizados, en cuyo fondo sedimentan los residuos a tratar. El agua así tratada suele necesitar un segundo tratamiento antes de su vertido.

4. 2. 2. 3. Tratamientos combinados

A menudo se emplean sistemas que combinan el tratamiento aerobio y anaerobio. Este es el caso de las denominadas *lagunas facultativas*, donde se da una zona superficial aerobia, una intermedia microaerófila y una inferior anaerobia. Las condiciones de aerobiosis en la superficie de la laguna pueden mantenerse empleando aireadores superficiales o mediante el crecimiento de algas. Estas últimas utilizan para la fotosíntesis el dióxido de carbono y el agua, liberando oxígeno. Actualmente, se están diseñando sistemas integrados bastante avanzados para el tratamiento de aguas en lagunas. En ellos, la depuración se suele iniciar en una laguna de anaerobiosis y se prosigue en una laguna aerobia, en la que predominan las algas, a su vez son eliminadas en otra laguna posterior por coagulación y flotación por aire disuelto. Las algas separadas pueden procesarse para su utilización en alimentación animal.

Otro ejemplo de tratamiento combinado es el proceso de *nitrificación-desnitrificación*, que se aplica a aguas residuales con un elevado contenido en material nitrogenado. En efluentes, el amoníaco puede encontrarse como contaminante inicial del agua o formarse durante la degradación aerobia de la materia orgánica. Las bacterias nitrificantes (*Nitrobacter*, *Nitrosomonas*) convierten el amoníaco en nitratos (nitrificación), siendo su actividad muy estrechamente dependiente de la temperatura y otras condiciones medioambientales. Como su crecimiento es más lento que el de las bacterias heterótrofas (responsables de la eliminación de los compuestos carbonados), la actividad de las bacterias nitrificantes es mayor en los fangos de edad avanzada. En la eliminación de los nitratos formados, participan microorganismos como *Pseudomonas denitrificans*, que se caracterizan por oxidar la materia orgánica en ausencia de oxígeno, empleando los nitratos como aceptores de electrones y liberando nitrógeno gaseoso.

En los procesos de nitrificación-desnitrificación se combinan pues tratamientos aerobios y anaerobios. La nitrificación puede realizarse en el mismo reactor aerobio en que tiene lugar la degradación de los compuestos carbonados o en uno independiente. En éste último caso, hay que tener en cuenta que, para que la desnitrificación tenga lugar, es necesario que además de nitratos, el agua contenga suficiente cantidad de materia orgánica; por ello, cuando el influente procede de un reactor convencional, es frecuente suplementarlo con compuestos orgánicos.

Las limitaciones legales para los vertidos de fósforo han condicionado el diseño de procesos para la *eliminación de fósforo*. Una de las alternativas disponibles es el uso de tratamientos biológicos, basados en la capacidad de algunos microorganismos aerobios, como *Acinetobacter*, para acumular intracelularmente el fósforo en forma de polifosfatos. Esta actividad se favorece notablemente en presencia de ácidos grasos de cadena corta. Como en la fase acidogénica de la depuración anaerobia se produce gran cantidad de este tipo de ácidos, normalmente los procesos que pretenden la eliminación de fósforo incluyen un tratamiento anaerobio, seguido de otro aerobio.

En algunas ocasiones, se pueden emplear procedimientos algo más complejos que favorecen la eliminación simultánea de fósforo y nitrógeno. Es el caso del proceso *Bardenpho*, que incluye un primer reactor anaerobio, en el que se favorece la producción de ácidos grasos volátiles; en un segundo se inicia la desnitrificación y la digestión de compuestos carbonados en condiciones de microaerofilia. A continuación, en un tercer reactor, aerobio, se completa el descenso de la DBO, al tiempo que se produce la nitrificación y la captación de fósforo. En el cuarto reactor, en condiciones de microaerofilia, se completa la desnitrificación y por fin, en un quinto paso el proceso finaliza con un reactor aerobio, cuyo objetivo es estabilizar la biomasa que contiene el fósforo, y separar el nitrógeno gaseoso anteriormente producido.

4. 3. Vertidos lácteos

Es relativamente frecuente que las industrias lácteas ubicadas en zonas rurales utilicen sus vertidos como agua de riego para cultivos agrícolas (Bull y col, 1981;

Groenewold, 1981; MMA, 1996; Wendorff, 1998). Esta alternativa es sencilla y barata, y conlleva un efecto fertilizante. Sin embargo, si el riego con vertidos lácteos se realiza con excesiva frecuencia, los suelos se compactan y acidifican, se producen olores desagradables, y aumenta el riesgo de contaminación por infiltración de los recursos hidráulicos subterráneos (Zall, 1992; MMA, 1996). Por ello, el volumen máximo de vertidos lácteos recomendado está entre los 10 y 15 m³/Ha/día, dejando 15-30 días entre cada irrigación (MMA, 1996) para que la microbiota del suelo asimile los sustratos lácteos sin que se pierda su capacidad depurativa (MMA, 1996; Wendorff, 1998).

Como ya se indicó anteriormente, predomina en los efluentes lácteos el material orgánico soluble y coloidal, por lo que la aplicación exclusiva de procedimientos fisico-químicos no permite generalmente obtener una reducción suficiente de la carga contaminante. Así pues, para tratar efluentes de la industria láctea se suelen emplear determinadas combinaciones de tratamientos fisico-químicos y biológicos (IDF, 1990; Wheatley, 1994; Mann, 1993), cuyas características principales se describen a continuación.

A pesar de que en los vertidos lácteos no abundan los sólidos en suspensión de gran tamaño, es aconsejable comenzar su depuración haciendo pasar el influente a través de tamices de malla metálica de 0,95 cm de tamaño de exclusión, como desbaste para eliminar restos groseros de cuajada, caseinatos, residuos de embalajes, etc. (Wheatland 1974; Wheatley, 1994; Wendorff, 1998).

La homogeneización de las aguas residuales lácteas en tanques de equilibrado es una operación crítica, tanto para aquellas que van a ser sometidas a tratamientos posteriores de depuración en la propia industria, como para las aguas que se viertan directamente a redes de saneamiento públicas, donde las fluctuaciones de composición y volumen de descarga del vertido, pueden llegar a afectar negativamente al funcionamiento de las depuradoras municipales (IDF, 1984; Wendorff, 1998).

Una práctica habitual en el tratamiento de efluentes lácteos es su neutralización por adición de ácidos (clorhídrico, nítrico o sulfúrico) o álcalis (sosa) (Rusten y col., 1993; IDF, 1997), particularmente cuando se va aplicar un tratamiento biológico posterior. Así, según un estudio realizado por la FIL (Federación Internacional de Lechería) en 1984, el

85% de las empresas lácteas encuestadas (representantes de 20 países) neutralizaban sus efluentes (IDF, 1984). Aunque el pH óptimo para aplicar un tratamiento aerobio se situa entre 7 y 7,5 (Bitton, 1994), a nivel de laboratorio se ha comprobado que, adaptando previamente la microbiota para la depuración aerobia, sería posible tratar aguas residuales lácteas alcalinas sin necesidad de proceder a su neutralización (Pereda y col., 1991). La biodegradación anaerobia de la materia orgánica es también y como ya se ha indicado, pH-dependiente; algunos autores (Kisaalita y col., 1987) han comprobado que el mantenimiento del pH entre 6 y 6,5 favorece la producción de ácidos orgánicos deseables (acético y butírico). El mezclado de las aguas residuales con las soluciones de neutralización se suele realizar en continuo en el tanque de homogeneización, con la ayuda de bombas de dosificación, conectadas a un pH-metro inmerso en el tanque. Recientemente, se ha probado con éxito el empleo de dióxido de carbono como agente neutralizante de efluentes, en una industria láctea británica; este compuesto no corrosivo se almacena en estado líquido en depósitos a alta presión (20 bares) y baja temperatura (-18°C), mezclándose con agua que se desvía y recircula al tanque de homogeneización (Anónimo, 1998b).

Excepto en el caso de los efluentes de queserías e industrias dedicadas a la obtención de caseinatos, el contenido de materiales en suspensión fácilmente sedimentables es relativamente bajo en los vertidos lácteos (Wendorff, 1998), por lo que no es frecuente el uso de decantadores primarios.

Aunque la flotación suele en general aplicarse tras la coagulación y/o floculación de los efluentes, en la industria láctea su empleo en las primeras fases de la depuración es importante, ya que permite descartar aceites y grasas que interfieren en los tratamientos biológicos posteriores (IDF, 1997). Los sistemas más empleados son la flotación por aire o por aire disuelto y los decantadores de grasa. En estos últimos, la grasa se separa por gravedad en depósitos rectangulares divididos en compartimentos; de forma que cantidades decrecientes de grasa flotante quedan retenidas en las sucesivas celdas, pasando el agua de una a otra por un conducto situado por debajo de la película de grasa (IDF, 1997). La eficacia de los separadores de grasa es menor cuando el pH del efluente es superior a 8 (IDF, 1997). El nivel de grasa estimado como aceptable para aplicar un

tratamiento biológico a un efluente lácteo, es de 100 mg/L. A este respecto, se ha observado que en el sector lácteo los efluentes con un mayor contenido en grasa proceden de las industrias elaboradoras de mantequilla (100-1000 mg/L) y las queserías (30-1000 mg/L) (IDF, 1997).

La coagulación química se utiliza ampliamente en el tratamiento de efluentes lácteos, permitiendo reducir la DQO en aproximadamente un 50% (Rusten y col., 1993; IDF, 1997). Con este procedimiento no se consigue sin embargo eliminar la lactosa. Dada la riqueza nutritiva del material lácteo precipitado y su posible utilización en alimentación animal, a menudo se recurre a la adición de agentes coagulantes de uso alimentario como quitosano, alginatos, ácido lignocelulósico o carboximetilcelulosa, en vez de a las tradicionales sales metálicas (Rusten y col., 1993; IDF, 1997; Ordolff, 1997; Mann, 1998b). Sin embargo, cuando el contenido en fósforo de las aguas residuales es elevado, las sales metálicas siguen siendo el coagulante de elección, ya que los productos antes citados no consiguen eliminar este elemento de forma eficaz (Rusten y col., 1993). Normalmente, y antes de proceder a la coagulación, el pH del efluente lácteo se ajusta a un nivel acorde con el tipo de agente coagulante seleccionado; así, en el caso de sales metálicas y carboximetilcelulosa se emplea un pH entre 4 y 5,5 (Rusten y col., 1993). Cuando los precipitados se destinan a la formulación de piensos, es más recomendable emplear como agente acidificante el ácido láctico (Rusten y col., 1993).

Existe un equipo comercializado específicamente para la industria láctea y conocido como “Zeda”, que combina la acidificación de los efluentes con ácido sulfúrico, su coagulación por adición de 6-10 mg/L de carboximetilcelulosa y la posterior separación de los precipitados por un sistema de flotación por aire disuelto (Mann, 1993; IDF, 1997). Con este proceso, instalado en numerosas industrias lácteas danesas y noruegas, es posible reducir la DQO inicial del efluente entre un 50 y un 60% (Mann, 1993; Rusten y col., 1993) además de eliminar hasta el 90% de la materia grasa (IDF, 1997).

La electrocoagulación ha sido empleada con éxito en algunas industrias lácteas rusas (Bull y col., 1981; Mann, 1998b). En este caso, los coagulantes se generan electroquímicamente, con electrodos que contienen hierro o aluminio. La corriente

eléctrica aplicada provoca la formación de hidróxidos metálicos de gran capacidad coagulante.

La separación por membranas es, sin duda, una de las tecnologías más eficaces para reducir la carga contaminante de las aguas residuales. Sin embargo, la frecuente necesidad de combinar varios tipos de separación, el uso de presiones altas y el precio de las membranas, suponen un coste económico demasiado elevado para numerosas industrias, incluida la láctea. Así, la microfiltración resulta eficaz para la recuperación de partículas relativamente grandes (Yacubowicz, 1996; Yip y col., 1996), mientras que la ultrafiltración combinada con ósmosis inversa permite además de recuperar proteínas, reducir la DBO de los vertidos lácteos en más de un 90% (Wheatland, 1974; Mann, 1979). El interés creciente por recuperar y reutilizar los agentes de limpieza, junto con el gran desarrollo experimentado por los procesos de separación por membranas, ha permitido la comercialización de algunos sistemas, como el denominado “AlkaSave” (Mann, 1979; Yacubowicz, 1996; Yip y col., 1996). Este sistema sirve para recuperar por nanofiltración las soluciones de sosa empleadas en la limpieza *in situ* de los equipos, que pueden reutilizarse entre 7 y 10 veces (Yacubowicz, 1996). Además, la retención de la mayor parte de los componentes lácteos de las aguas de lavado se traduce en una reducción del 95% de su DQO. Si el líquido retenido por la membrana se somete a un tratamiento posterior por diafiltración, para eliminar restos de sosa, se puede emplear en la formulación de piensos (Yacubowicz, 1996).

Una vez que los efluentes lácteos se han acondicionado mediante la aplicación en serie de varios de los procedimientos físico-químicos ya descritos, como homogeneización, neutralización y separación de grasas, ya pueden ser tratados biológicamente (IDF, 1990; Carballo, 1994; Wheatley, 1994). Tradicionalmente, en la industria láctea se han empleado tratamientos aerobios (Pereda y col., 1996; Wendorff, 1998). En los años 70 comenzaron los estudios de laboratorio para la aplicación de tratamientos anaerobios a efluentes lácteos de elevada carga orgánica (IDF, 1990). En las primeras experiencias industriales, llevadas a cabo 10 años más tarde, se observó ya que la reducción de la carga orgánica podía llegar a ser del 90% para efluentes con una DQO superior a los 1.500 mg /L (IDF, 1990; Wendorff, 1998). No obstante, estos niveles de

reducción pueden no ser suficientes para descargar el efluente tratado a un cauce fluvial (IDF, 1990), haciendo necesario un paso aerobio posterior (IDF, 1990). Una limitación inicial de los tratamientos anaerobios era su poca eficacia para depurar vertidos lácteos con DQO inferior a 1.000 mg/L (Ndon y Dague, 1997); esto ha sido superado con la puesta a punto de procesos más lentos que operan a temperaturas más bajas (16-25°C) (Kato y col., 1994; Viraraghavan y Varadarajan, 1996; Ndon y Dague, 1997).

Los fangos activados constituyen uno de los métodos más populares, particularmente en EEUU, para el tratamiento aerobio de aguas residuales lácteas (Bull y col., 1981; Wendorff, 1998). Sin embargo, los sistemas convencionales de fangos activados no resultan muy apropiados para el tratamiento de aguas de elevada carga orgánica, ya que necesitan mucho tiempo (15-40 h; Wendorff, 1998) para reducir la DQO, y con frecuencia dan lugar a los no deseados fangos voluminosos de difícil sedimentación (*bulking*) (Stover, 1993; Mino, 1995; Donkin, 1997).

La mayor parte de los estudios microbiológicos sobre tratamientos aerobios de la industria láctea, se han realizado tan sólo para caracterizar la microbiota responsable del mencionado *bulking* (Mino, 1995; Donkin, 1997). Tradicionalmente se ha dado por hecho que la naturaleza microbiana de estos fangos era similar a la de los procedentes de aguas residuales urbanas (Wendorff, 1998). Sin embargo, recientemente Manz y col. (1994) han observado que existen diferencias notables entre la composición de un fango aerobio lácteo (procedente de un proceso SBR) y uno urbano (procedente de un sistema convencional). Utilizando técnicas de ribotipado, y con la librería genética propuesta por Woese (1987), estos autores observaron que el 85% de los microorganismos procedentes del fango lácteo resultaban hibridados con la sonda del grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, mientras que tan sólo lo hacía así el 23% de los de los fangos de origen urbano. Según estos autores, dentro de este grupo filogenético se incluyen las bacterias de los géneros *Cytophaga*, *Flavobacterium* y *Haliscomenobacter* (bacteria filamentosa). El grupo filogenético de las bacterias Gram-positivas con alto contenido en guanina y citosina (entre las que se encontrarían los géneros *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* y *Arthrobacter*) abarcaba a un 23 y el 9%, respectivamente, de las poblaciones de los fangos lácteo y urbano. Las bacterias pertenecientes al grupo

filogenético proteobacterias resultaron ser más abundantes en los fangos urbanos que en los lácteos (Manz y col., 1994).

Durante el proceso de fangos activados con aguas residuales lácteas, es necesario extremar las precauciones para evitar tanto la aparición del *bulking*, como la formación de espumas. Aunque existen distintos tipos de *bulking*, el que predomina en la industria láctea es el debido al crecimiento excesivo de bacterias filamentosas. Este tipo de bacterias se caracteriza por tener una superficie celular muy grande, lo que reduce considerablemente su capacidad de sedimentación (Bitton, 1994; Droste, 1997). Tienen también una afinidad mayor que las bacterias floculantes por numerosos sustratos, lo que determina su predominio en algunas ocasiones (Stover, 1993; Bitton, 1994; Donkin, 1997). Así, cuando el nivel de oxígeno disuelto es bajo, o el efluente es deficitario en algún nutriente, como nitrógeno o fósforo, siendo rico en lactosa, se fomenta la proliferación de las bacterias filamentosas (Stover, 1993; Bitton, 1994; Donkin, 1997). A partir de fangos lácteos voluminosos se han aislado bacterias filamentosas como *Sphaerotilus natans*, los Tipos 021N y 0961 de Eikelboom, y *Nocardia* (Bergey's Manual, 1989; Stover, 1993; Mino, 1995). Una de las alternativas para minimizar el crecimiento de estas bacterias es la adición de agentes oxidantes, como cloro o peróxido de hidrógeno, bien en el tanque de aireación o en los fangos recirculados (Bitton, 1994; Donkin, 1997).

Algunas de las bacterias filamentosas citadas, como *Nocardia*, *Rhodococcus* o *Microthrix*, pueden participar en la formación de espumas de color marrón en los tanques de aireación. Aunque la formación de espumas en estos reactores puede deberse también a la presencia de proteínas lácteas o detergentes, las espumas de origen microbiano son particularmente peligrosas para el personal de la planta depuradora ya que existe el riesgo de que en ellas proliferen patógenos oportunistas como *Nocardia asteroides* (Bitton, 1994). Además, las espumas modifican la transferencia de oxígeno y suelen asociarse a la aparición de olores desagradables (Stover, 1993). Los surfactantes aniónicos y sus productos de degradación son especialmente problemáticos, al favorecer el crecimiento de *Nocardia* en los fangos activados (Bitton, 1994).

Como ya se ha indicado anteriormente, el procedimiento convencional con fangos activados no es muy apropiado para el tratamiento de vertidos lácteos de alta carga

orgánica. En su lugar, suelen emplearse otros sistemas, como los de aireación prolongada, de oxígeno puro, o de contacto y estabilización, que permiten reducciones de la DQO superiores al 90% (Bull y col., 1981; López Mateos y Mastral Lajusticia, 1986, Carballo, 1994; Wendorff, 1998). Quizás el proceso más común sea el reactor discontinuo secuencial (SBR), ya que además de limitar el *bulking*, permite regular las condiciones de aireación para que tengan lugar simultáneamente los procesos de nitrificación-desnitrificación y de eliminación de fósforo (Malaspina y col., 1995; Kolarski y Nyhuis, 1996; Donkin, 1997; Wendorff, 1998).

Los procesos aerobios de película fija se han venido empleando más en la industria láctea europea que en la norteamericana (Bull y col., 1981). No obstante, estos procesos originan olores más desagradables que los de fangos activados (Elkin, 1984; Wheatley, 1994). La moderada reducción de la DQO (alrededor del 75-85%) proporcionada por un único filtro percolador para vertidos lácteos (Wendorff, 1998), ha fomentado el desarrollo de procesos con varias unidades, o que incluyen otro tipo de tratamiento aerobio (Mann, 1979; Groenewold, 1981; Bull y col., 1981; Elkin, 1984; Wheatley, 1994). Las unidades de contacto biológico rotativo también se emplean a menudo, solas o combinadas, para disminuir el poder contaminante de las aguas de origen lácteo (Bull y col., 1981; Carballo, 1994). Para fomentar la biodegradación del material nitrogenado, se recomienda emplear dos unidades, una a baja velocidad, donde los compuestos carbonados son oxidados, y otra con velocidad rotacional mayor, para favorecer la proliferación de las bacterias nitrificantes (Wendorff, 1998).

Cuando se va a aplicar un tratamiento anaerobio a un determinado effluente lácteo, hay que tener en cuenta que algunos de sus componentes pueden tener un efecto negativo sobre la microbiota implicada. Así, cuando la materia grasa es hidrolizada por la flora lipolítica del fango, la acumulación de productos de degradación, particularmente de los ácidos grasos de cadena larga (oleico, palmítico, mirístico y esteárico), puede llegar a inhibir el crecimiento de las bacterias metanogénicas (Morgan y col., 1991; Perle y col., 1995). Los lípidos además, pueden disminuir la eficacia de los tratamientos anaerobios al favorecer la flotación de los fangos, modificar las características de los gránulos de los reactores UASB o reducir la velocidad de flujo en los reactores de lecho compacto (IDF,

1990; Perle y col., 1995; Petruy y Lettinga, 1997). De ahí que se aconseje eliminar previamente la grasa del vertido por un procedimiento físico-químico hasta una concentración máxima de 100 mg/L (Perle y col., 1995). También se ha sugerido el empleo de compuestos surfactantes que no afecten a la microbiota anaerobia, como sodio lauril sulfato, Tween-80, Triton-X100 o Tegopren 3022 (Patel y Madamwar, 1998).

Al ser la lactosa uno de los componentes mayoritarios de los efluentes lácteos, su utilización por parte de la microbiota anaerobia ha sido objeto de numerosos estudios. Se sabe que durante la primera fase de la digestión anaerobia, los organismos hidrolítico-fermentativos lactasa positivos metabolizan este azúcar por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP); a partir del piruvato se producen entonces diversos ácidos orgánicos (lactato, formato, butirato, propionato, entre otros), así como etanol, hidrógeno y dióxido de carbono; siendo el lactato el principal metabolito intermediario (Figura 8) (Pipyn y Verstraete, 1981; Chartrain y Zeikus, 1986a; Kisaalita y col., 1987). La microbiota responsable de estas primeras transformaciones en vertidos lácteos, ha sido caracterizada parcialmente, identificándose bacterias lácticas (*Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc mesenteroides*), enterobacterias (*Klebsiella oxytoca*) y *Clostridium butyricum* (Chartrain y Zeikus, 1986b; Morgan y col., 1991; Fournier y col., 1993). Entre las bacterias que participan en la fase acidogénica-acetogénica durante el tratamiento de vertidos lácteos Chartrain y Zeikus (1986b) han identificado a *Clostridium propionicum* y *Desulfovibrio vulgaris*.

Además de las bacterias ya descritas, otros géneros pueden participar en la fase acidogénica-acetogénica, en la que a partir de distintos sustratos (azúcares, ácidos orgánicos) se producen otros ácidos orgánicos, fundamentalmente acético (Figura 8) (Chartrain y Zeikus, 1986a; Kisaalita y col., 1989). Normalmente, estas transformaciones tienen lugar a gran velocidad, de forma que no es usual detectar grandes cantidades de ácido láctico en los digestores anaerobios (Chartrain y Zeikus, 1986a; Kisaalita y col., 1987; Yang y col., 1988). Las bacterias acetogénicas se caracterizan por producir acetato a partir de distintos ácidos orgánicos y alcoholes. Esta conversión es más lenta cuando utilizan el ácido propiónico como sustrato en vez de ácido butírico (Kisaalita y col., 1987; Yu y Pinder, 1993b). Este fenómeno se debe a que estas reacciones sólo transcurren en

este sentido cuando la presión parcial de hidrógeno es baja. Esto suele lograrse gracias a que las bacterias metanogénicas utilizan el hidrógeno como sustrato. Esta simbiosis es una forma de *asociación sintrófica* (Bryant, 1979; Gottschalk, 1986). Dado que la cantidad de hidrógeno liberado en la degradación del ácido propiónico es mayor que la del ácido butírico, la conversión del primero es más lenta (Figura 8).

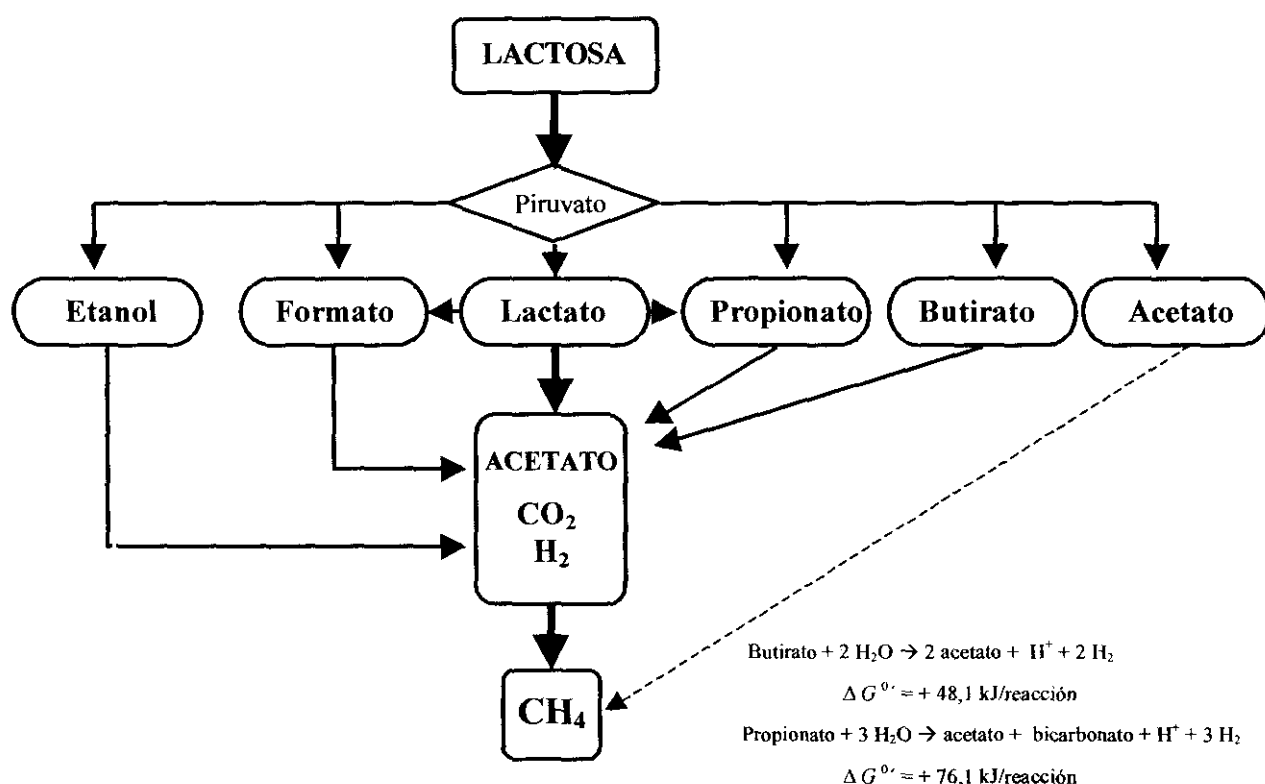


Figura 8. Posibles rutas metabólicas para la producción de metano a partir de lactosa.

Otro factor importante, además del pH, que afecta los rendimientos de conversión acidogénica es la concentración inicial de lactosa en los vertidos lácteos. En este sentido, se ha constatado que las concentraciones altas de este azúcar en el agua residual no modifican significativamente la cantidad de acetato producido, pero sí la de butirato,

además de favorecer la multiplicación celular (Chartrain y col., 1987; Yu y Pinder, 1993b).

Respecto a la flora metanogénica asociada a la depuración de efluentes lácteos, se sabe que suele predominar *Methanobacterium formicicum*, que utiliza el hidrógeno para formar metano, y en menor proporción *Methanosarcina* sp. y *Methanothrix* sp., que producen este gas a partir del ácido acético (Chartrain y Zeikus, 1986b; Morgan y col., 1991).

Algunas de las bacterias implicadas en depuración anerobia, como *Leuconostoc mesenteroides*, *Klebsiella oxytoca*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Methanosarcina* sp. y *Methanothrix* sp., se caracterizan por producir grandes cantidades de exopolisacáridos (Chartrain y Zeikus, 1986b; Beech y col., 1991; Bergey's Manual, 1989, Morgan y col., 1991), que presumiblemente participan en la formación de flóculos (cultivos en suspensión) y biofilms (cultivos de película fija).

En la industria láctea los procesos anaerobios a base de cultivos en suspensión permiten reducir la DQO de los vertidos entre el 75 y el 85%, liberando biogas con un 50-67% de riqueza en metano (IDF, 1990; Stafford, 1992; Wendorff, 1998).

Quizás uno de los principales avances tecnológicos en este tipo de tratamientos, sea la utilización de cultivos iniciadores. En este sentido, se ha propuesto el empleo de bacterias acidogénicas aisladas de fangos lácteos, como *Leuconostoc mesenteroides*, *Desulfovibrio vulgaris* y *Klebsiella oxytoca*, de forma aislada o combinada (Chartrain y col., 1987; Strydom y col., 1997). Algunos autores sugieren incluso el empleo de inóculos de bacterias metanogénicas (Chartrain y col., 1987; Yang y col., 1988). Una forma de inóculo algo burda pero posiblemente adecuada en algunos casos, es la adición, al agua residual láctea, de excrementos vacunos (Fournier y col., 1993).

Aunque las reducciones de la DQO obtenidas (60-98%) al aplicar procesos de película fija son similares a las de los cultivos en suspensión, el contenido en metano del biogas producido puede ser ligeramente superior (54-75%) (Córdoba y col., 1984; De Haast y col., 1985; Monroy y col., 1994; Patel y Madamwar, 1997). Sin embargo, y como

ya se señaló anteriormente, la presencia de grasa láctea limita a menudo la eficacia depurativa de este tipo de procesos (Monroy y col., 1994).

Se ha observado por otra parte, que cuando se emplea un reactor de película fija de lecho compacto para tratar suero, los soportes más adecuados son los porosos (carbón vegetal o vidrio sinterizado). La microbiota se acantona en sus cavidades y, por tanto, se encuentra más protegida de las inclemencias del proceso (Anderson y col., 1994; Patel y col., 1995). Si se emplea un reactor de lecho fluidificado para tratar efluentes lácteos, los materiales de elección parecen ser los arcillosos (bentonita y saponita), menos densos y con mejores prestaciones que los arenosos (Borja y col., 1992; Morgan y col., 1991). Recientemente, se han ensayado con éxito nuevos soportes poliméricos naturales, como quitosano-lignosulfonato, para inmovilizar la microbiota anaerobia para el tratamiento de aguas residuales de industrias alimentarias (Tartakovsky y col., 1998).

Aunque la disminución de la carga contaminante obtenida mediante el empleo de reactores híbridos es similar a la proporcionada por los de película fija, su implantación en la industria láctea es superior (IDF, 1990; Stafford, 1992; Hernández Suárez, 1994; Kalyuzhnyi y col., 1997). En España, por ejemplo, una importante empresa láctea trata sus efluentes en un reactor de tipo UASB (Hernández Suárez, 1994).

Los gránulos desarrollados en un reactor UASB durante el tratamiento de un efluente lácteo han sido parcialmente caracterizados por MacLeod y col. (1990). Estos autores han observado que *Methanothrix* es el microorganismo mayoritario en la porción central de los gránulos, donde se encuentra embebido en una matriz exopolimérica que presenta cavidades, originadas presumiblemente por la acumulación de metano. En una capa más externa se sitúan las bacterias acetogénicas y metanogénicas hidrogenotróficas, y en las capas más superficiales, las fermentativas y acidogénicas, todas ellas retenidas por el entramado exopolimérico. Es conocido el hecho de que cuando es alto el contenido orgánico del agua residual láctea, especialmente el graso, los gránulos presentan un tamaño inferior (IDF, 1990; Petruy y Letinga, 1997). Asimismo, una excesiva acidificación de las aguas puede modificar la conformación y actividad de los gránulos, fenómeno frecuente en el tratamiento de suero de quesería (IDF, 1990; Yan y col., 1993; Kalyuzhnyi y col., 1997). La capacidad de *Desulfovibrio* spp. (bacteria aislada de fangos

lácteos; Chartrain y Zeikus, 1986b) para utilizar ácido acético, compitiendo con la flora metanogénica (Bitton, 1994), podría estar implicada en la producción excesiva de ácido sulfídrico observada, durante el tratamiento de efluentes lácteos, en los reactores UASB (Hernández Suárez, 1994).

Sin lugar a dudas, el principal problema de la depuración anaerobia de los efluentes lácteos ricos en lactosa, es la tendencia a una acidificación excesiva (digestores agrios), lo que hace disminuir el rendimiento de metano; este hecho determina la necesidad de regular el pH durante todo el proceso (Kisaalita y col., 1987; Yan y col., 1993; Monroy y col., 1994; Kalyuzhnyi y col., 1997). Por esta razón, la industria láctea es pionera en el desarrollo de tratamientos anaerobios en dos fases, una acidogénica-acetogénica y otra metanogénica (IDF, 1990; Strydom y col., 1997; Ince, 1998). Aunque estas fases se suelen llevar a cabo en dos reactores independientes, se ha propuesto el empleo de reactores híbridos de flujo descendente-ascendente para el tratamiento de suero de quesería (Malaspina y col., 1996). Estos reactores están divididos internamente en dos secciones independientes; en una de ellas, dedicada a la fase acidogénica, el agua residual atraviesa con un flujo descendente un lecho compacto, quedando retenida en el fondo del tanque, donde prosigue la bioconversión en ácidos orgánicos por parte de la microbiota suspendida. A continuación, el líquido pasa a la otra sección (fase metanogénica) con un flujo ascendente; allí, en primer lugar es biodegradado por la microbiota suspendida y finalmente por la inmovilizada en el lecho compacto. Aunque aún en fase experimental, otra modificación bastante prometedora del tratamiento en dos fases, es la conocida como “Substrate Shuttle”, que introduce una unidad de intercambio iónico para disminuir el contenido en ácidos orgánicos del agua procedente del reactor de acidogénesis, antes de ser incorporada al de metanogénesis (Cohen y col., 1994).

Después de un tratamiento biológico, es posible aplicar algún tipo de lagunaje para disminuir aún más la carga orgánica contaminante global, o bien el contenido en N y/o P de los efluentes lácteos (Wendorff, 1998). Recientemente, se ha propuesto la utilización controlada de algas, como *Phormidium*, *Oscillatoria* y *Lygbya*, en el tratamiento avanzado aerobio de este tipo de vertidos (Blier y col., 1996; Espigares y col., 1997).

5. LEVADURAS EN MEDIOS LÁCTEOS

5. 1. Levaduras que utilizan lactosa: principales géneros y especies

Las levaduras han convivido con el hombre desde el Neolítico, fermentando los carbohidratos de diversos cereales, frutas, tubérculos y leche de diversas especies animales, dando lugar a una gran variedad de alimentos tradicionales que se utilizan hasta nuestros días. También pueden ser causantes del deterioro de algunos productos alimenticios con un contenido en agua relativamente bajo.

Las levaduras son hongos unicelulares cuya reproducción vegetativa es principalmente por gemación, y en algunas especies por fisión (Lodder, 1971; Kreger-van Rij, 1984a). Su reproducción sexual tiene lugar mediante esporas dentro de ascas, o a través de basidios. Esta diferencia en su reproducción sexual permite dividir las taxonómicamente en dos clases, Ascomicetos y Basidiomicetos. Hay especies en las que no se reconoce morfológicamente su estado sexual, que constituyen una tercera clase, los Deuteromicetos u hongos imperfectos. Actualmente, se conoce el estado “perfecto” de muchas levaduras antes descritas como imperfectas, de manera que existen especies de levaduras con dos denominaciones distintas, una para la forma perfecta y otra para la imperfecta (Kreger-van Rij, 1984a; Frazier y Westhoff, 1993).

En los últimos años se viene intentando poner a punto, con fines taxonómicos, nuevas técnicas de identificación basadas en pruebas bioquímicas y genéticas sofisticadas (Fung y Liang, 1990; De Groote y col., 1995; Welthagen y Viljoen, 1997; Costabeber y col., 1998). Sin embargo, todavía es necesario recurrir a las pruebas morfológicas y fisiológicas tradicionales para llegar a identificar de forma segura las levaduras de origen alimentario (Costabeber y col., 1998). Estas pruebas tienen el inconveniente de ser largas y tediosas, y de requerir bastante experiencia para interpretar los resultados (van der Walt, 1971; van der Walt y Yarrow, 1984; Barnett y col., 1990a). Por esta razón, se han desarrollado sistemas rápidos, que incluyen algunas pruebas fisiológicas y morfológicas, junto con programas informáticos que facilitan la interpretación de los datos obtenidos (Deák y Beuchat, 1987; Barnett y col., 1990a; Barnett y col., 1990b; Kotzekidou, 1997; Praphailong y col., 1997). Los estudios taxonómicos se reflejan en la reordenación y

continua aparición de nuevas especies, e incluso de géneros de levaduras. Kreger-van Rij (1984a) citaba la existencia de 500 especies y de 60 géneros en el año 1984. Actualmente, existen aproximadamente unas 700 especies reconocidas, englobadas en 90 géneros (Boekhout y Kurtzman, 1996).

De este amplio y variado número de levaduras tan solo alrededor de un 15 % utilizan la lactosa en mayor o menor grado (Tabla 9). La utilización de la lactosa no es una característica metabólica asociada a género (ver Tabla 9). Dentro del género *Candida*, por ejemplo, hay especies que utilizan y fermentan este azúcar (ej. *C. kefir*), otras que sólo lo utilizan (ej. *C. intermedia*) y otras que no son capaces de utilizarlo (ej. *C. albicans*) (Meyer y col., 1984). Destacan las especies *K. marxianus*, *K. lactis* y *C. kefir* por su rapidez en el consumo de lactosa, siendo frecuentemente cultivadas, incluso a escala industrial, sobre este sustrato para la producción de biomasa, etanol, β -galactosidasa, y otros productos comerciales. Además, una de ellas (*K. marxianus*) al estar aceptada por la FDA (Food and Drug Administration de Estados Unidos) como sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe) (Harden, 1996) puede ser empleada como ingrediente de productos alimenticios para consumo humano. A continuación se enumeran algunas de las principales características de las especies que vamos a estudiar en este trabajo.

El género *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt, es un ascomiceto teleomórfico ó perfecto, con 13 especies aceptadas, que vegetativamente se reproduce por gemación multipolar y puede desarrollar pseudohifas. Sus ascas pueden ser esféricas o elongadas y se presentan normalmente no conjugadas. Una característica del género es la delicuescencia de la pared de las ascas al madurar. Todas las especies de *Kluyveromyces* tienen, de forma característica, en su cadena respiratoria, Co Q-6¹. La mayoría presenta entre 1-4 ascosporas, que son lisas y de forma entre esferoidal y reniforme. Todas las especies fermentan glucosa, y algunas también lactosa (*K. lactis* y *K. marxianus*). *K. lactis* se ha convertido en la especie de levaduras más estudiada desde un punto de vista genético después de *Saccharomyces cerevisiae* (Wésolowski-Louvel y col., 1996).

¹ La estructura del sistema ubiquinona o coenzima Q de la cadena respiratoria varía en el número de unidades isopreno que la integran y es una característica empleada en diferenciación taxonómica ya que varía de unas levaduras a otras; los ascomicetos poseen entre 6 y 10, y los basidiomicetos entre 8 y 10 unidades (van der Walt y Yarrow, 1984).

Tabla 9. Levaduras capaces de utilizar lactosa.

Género	Número de especies ^{1,2}			
	Crecimiento en lactosa		Fermentación de lactosa	
	+	v	+	v
<i>Aessosporon</i>	0	1	0	0
<i>Brettanomyces</i>	2	1	2	0
<i>Bullera</i>	3	0	0	0
<i>Candida</i>	17	11	1	1
<i>Cryptococcus</i>	8	7	0	0
<i>Debaryomyces</i>	2	4	0	1
<i>Filobasidium</i>	1	0	0	0
<i>Hansenula</i>	1	1	0	0
<i>Kluyveromyces</i>	4	2	1	3
<i>Leucosporidium</i>	1	1	0	0
<i>Lipomyces</i>	0	4	0	0
<i>Pichia</i>	4	0	0	0
<i>Rhodospiridium</i>	0	2	0	0
<i>Rhodotorula</i>	0	5	0	0
<i>Sarcinosporon</i>	1	0	0	0
<i>Sporobolomyces</i>	2	0	0	0
<i>Sterigmatomyces</i>	3	2	0	0
<i>Torulopsis</i>	1	2	0	1
<i>Trichosporon</i>	2	3	0	1
Total	52	46	4	7

Tomado de Castillo (1990)

¹ El símbolo + indica rápida utilización de lactosa² El símbolo v indica que algunas cepas utilizan la lactosa y otras no, o bien que la utilización es ligera, lenta o poco caracterizada

Actualmente se aceptan 14 especies dentro del género *Debaryomyces* Lodder et Kreger-van Rij (también ascomiceto teleomórfico), pobres fermentadoras de azúcares en general. Poseen el sistema Co Q-9. Su reproducción es similar a la del género *Kluyveromyces* y sus ascas son de pared resistente, con 1-4 esporas esféricas u ovals de paredes verrucosas (Boekhout y Kurtzman, 1996). Las especies *Deb. hansenii* y *Deb. polymorphus*, se caracterizan por utilizar la lactosa, pero no pueden fermentarla.

Dentro del muy heterogéneo género *Candida* Berkhout (160 especies) (Boekhout y Kurtzman, 1996), se incluyen *C. kefir*, *C. sphaerica* y *C. famata*, que son las formas

imperfectas de *K. marxianus*, *K. lactis* y *Deb. hansenii*, respectivamente. Estas especies, englobadas durante muchos años dentro de la clase Deuteromycetos, están clasificadas actualmente como Ascomicetos anamórficos ó imperfectos. Presentan gemación multipolar (Boekhout y Kurtzman, 1996).

Se presentan en la Tabla 10 las diversas denominaciones de varias levaduras, ya que muchas de las especies que se citarán en este trabajo han tenido previamente otro nombre taxonómico. En este trabajo se emplea para el género *Kluyveromyces* la nomenclatura de Lachance (1993), preliminar a la 4ª edición oficial de la clasificación taxonómica de levaduras.

Tabla 10. Diversas denominaciones de algunas de las levaduras empleadas en esta tesis.

Denominación aquí	Denominaciones anteriores (Basónimos)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Deb. subglobosus</i> <i>Torulaspora hansenii</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ¹	<i>Saccharomyces kefir</i> <i>S. fragilis</i> <i>S. marxianus</i> <i>K. fragilis</i> <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> <i>K. bulgaricus</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> ¹	<i>S. lactis</i> <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i> <i>K. lactis</i>
<i>Candida kefir</i> ²	<i>C. pseudotropicalis</i> <i>Torulopsis kefir</i> <i>Torula cremoris</i>

¹ Nomenclatura según Lachance (1993).

² Estado imperfecto o asexual de *K. marxianus*

En los últimos años, se han obtenido cepas pertenecientes a especies naturalmente no utilizadoras de lactosa que por modificación genética han sido dotadas con la capacidad de transformar este azúcar (Weusthuis y col., 1994; Compagno y col., 1995; Rubio-Teixeira y col., 1998). Se pretende así que especies ó cepas GRAS, como *Saccharomyces cerevisiae*, puedan servir para la elaboración de productos lácteos para consumo humano. Generalmente se insertan los genes *LAC12* y *LAC4* de la especie *K. lactis* que son los que confieren la capacidad de transporte y producción de β -galactosidasa, respectivamente (Wésolowski-Louvel y col., 1996).

5. 2. Levaduras deseables en quesos y leches fermentadas

Puede decirse que entre las levaduras que son contaminadoras naturales en la industria láctea, las especies no fermentadoras de lactosa y halotolerantes suelen ser más frecuentes que las fermentativas (Besaçon y col., 1992; Rohm y col., 1992; Viljoen y Greyling, 1995; Serrano y col., 1996; Roostita y Fleet, 1997; Welthagen y Viljoen, 1998; Westall y Filtenborg, 1998a). Entre las especies más comúnmente presentes, suele predominar, la alguna vez deseable, *Deb. hansenii* y su forma imperfecta *C. famata* (hasta el 50% de las cepas aisladas) (Fleet y Mian; 1987; Besaçon y col., 1992; Rohm y col., 1992; Sarais y col., 1996; Serrano y col., 1996; Roostita y Fleet, 1997; Welthagen y Viljoen, 1998; Wyder y Puhán, 1999). Algunas levaduras con gran capacidad fermentativa de lactosa, como *K. marxianus* o *K. lactis* se encuentran también en este entorno ambiental, pero en mucha menor proporción (Besaçon y col., 1992; Rohm y col., 1992; Viljoen y Greyling, 1995; Sarais y col., 1996; Roostita y Fleet, 1997; Welthagen y Viljoen, 1998; Westall y Filtenborg, 1998a), igual que las correspondientes formas imperfectas. También se aíslan con cierta frecuencia de productos lácteos especies pertenecientes a los géneros *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Yarrowia* y *Candida* (Fleet, 1990).

En los quesos se encuentran presentes levaduras, que directa o indirectamente, contribuyen a su aroma, sabor y textura, aunque no siempre se conozcan con exactitud los compuestos y mecanismos bioquímicos implicados (Devoyod, 1970; Schmidt y col.,

1979; Fleet y Mian, 1987; Fleet, 1990). Algunas especies contribuyen a la maduración del producto produciendo vitaminas o utilizando el ácido láctico, elevando así el pH, lo que favorece el crecimiento de las bacterias proteolíticas y lipolíticas implicadas en los procesos madurativos (Fleet, 1990; Rohm y col., 1992; Viljoen y Greyling, 1995). Otras son capaces de producir sus propias enzimas lipolíticas y proteolíticas, participando así directamente en la maduración; otras aún fermentan la lactosa, produciendo compuestos que contribuyen al sabor y el aroma (Viljoen y Greyling, 1995). Este es el caso de algunos compuestos volátiles producidos por levaduras (etanol, acetaldehídos, etilbutiratos, etilacetatos), que imparten aroma y sabor característicos en ciertas variedades de quesos azules (Fleet, 1990; Viljoen y Greyling, 1995). También se ha descrito el efecto positivo de las levaduras sobre la calidad de los quesos, por su acción degradadora de las aminas allí presentes; recuérdese que la ingestión de alimentos ricos en aminas (como algunos quesos muy madurados), y más aún si coincide con la de bebidas alcohólicas, puede antagonizar la acción de fármacos antidepresivos del tipo IMAO (inhibidores de la monoamino-oxidasa), como el Prozac (Besaçon y col., 1992).

La mayoría de las levaduras proceden de la leche cruda, y de contaminaciones que ocurren durante el proceso de fabricación (Fleet, 1990). Por eso, un mismo tipo de queso puede presentar una flora levadúrica muy distinta en función de su lugar de procedencia (Westall y Filtenborg, 1998a). En la maduración de los quesos azules (Roquefort, Cabrales, Gorgonzola) está reconocida la contribución de levaduras (*Deb. hansenii*, *S. cerevisiae*, *Candida* sp., *K. marxianus* y *K. lactis*) (Besaçon y col., 1992; Jakobsen y Narvhus, 1996; Johnson, 1998). También en quesos Feta, Camembert, Brie y otros de pasta blanda, en cuya superficie abundan estas especies, junto con *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Geotricum candidum* (Jakobsen y Narvhus, 1996; Johnson, 1998; Wyder y Puhán, 1999).

Determinadas levaduras están implicadas en procesos de elaboración de leches fermentadas como el kefir y el kumiss. Concretamente *C. kefir*, *S. cerevisiae* y *S. delbrueckii* son necesarias para la producción de etanol, CO₂ (son bebidas efervescentes) y determinados aromas (Jakobsen y Narvhus, 1996). El kefir se fabrica con leche de cabra o vaca y tiene una textura de gel suave conteniendo aproximadamente un 0,8% de ácido

láctico y un 1% de etanol, además de CO₂ (Rose, 1982). La compleja flora levadúrica del kefir ha sido descrita por varios autores (Marshall y col., 1984; Fleet, 1990; Rohm y col., 1992; Angulo y col., 1993; Tamime y Marshall, 1997), e incluye especies que fermentan la lactosa como *K. marxianus*, *K. lactis*, *C. kefir*, *Pichia fermentor* y otras que no la fermentan como *S. cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii* (Rohm y col., 1992; Angulo y col., 1993; Tamime y Marshall, 1997; Gilliland, 1998). El kumiss se elabora con leche de yegua ó vaca, y es un producto líquido y gaseoso, con bastante ácido láctico (0,7-1,8%) y etanol (1-2,5%), además de CO₂ (Rose, 1982). Entre su flora se encuentran algunas especies fermentadoras de la lactosa (*K. lactis*, *Torula koumis*, etc.) y otras que no la fermentan (*S. cartilagenosus*) (Tamime y Marshall, 1997).

Algunos autores (Seiler y Busse, 1990; Viljoen y Greyling, 1995; Jakobsen y Narvhus, 1996) han propuesto la incorporación de *K. marxianus* y *Deb. hansenii* a cultivos iniciadores comerciales para mejorar las características organolépticas de diversos tipos de queso, pero ésto aún no es una práctica consolidada.

5. 3. Levaduras contaminantes en instalaciones y productos lácteos

En el caso concreto de quesos y yogures, las levaduras han sido más estudiadas como contaminantes y posibles causantes de defectos, que como agentes de transformaciones deseables (Fleet y Mian, 1987; Rohm y col., 1992; Jakobsen y Narvhus, 1996). La mayoría de los contaminantes se incorporan después del tratamiento higienizante de la leche procediendo de superficies, suero, salmueras, etc. (Seiler y Busse, 1990; Viljoen y Greyling, 1995; Johnson, 1998). A menudo no es posible afirmar con certeza que una levadura sea responsable de deterioro, aunque se encuentre en alta concentración como contaminante de un producto lácteo. En algunos casos, el mismo organismo que anteriormente había sido considerado como contaminante indeseable, ha sido después identificado como responsable de algún aspecto deseable de la maduración del queso (Marshall y col., 1984; Fleet, 1990; Seiler y Busse, 1990; Rohm y col., 1992; Angulo y col., 1993; Viljoen y Greyling, 1995; Tamime y Marshall, 1997; Gilliland, 1998).

Entre las levaduras aisladas de quesos y asociadas a defectos, son frecuentes *Deb. hansenii*, *K. marxianus*, *K. lactis* y *S. cerevisiae*, consideradas a veces como responsables de la formación de aromas afrutados o a levadura y de sabores amargos o rancios, de cambios de textura y de formación excesiva de gas (Walker y Ayres, 1970; Miller, 1979; Johnson, 1998; Westall y Filtenborg, 1998b). Algunas alteraciones de los quesos se relacionan con la presencia de levaduras fermentadoras de lactosa (Guiraud y Galzy, 1976; Romano y col., 1989; Fleet, 1990; Viljoen y Greyling, 1995). Así, Romano y col. (1989) han asociado la presencia de *K. marxianus* con la formación de gas en quesos Parmesanos. Una variante de alteración de queso fresco con formación de gas y sabores picantes, ha sido atribuida exclusivamente a *Candida sphaerica* (forma asexual de *K. lactis*) (Guiraud y Galzy, 1976). Esta misma especie se ha visto implicada en diversas formas de deterioro de quesos Gouda, Cheddar, Stracchino (Viljoen y Greyling, 1995; Fleet, 1990; Fleet y Mian, 1987; Sarais y col., 1996), con formación de grandes cantidades de gas (provocando hinchamiento) y modificaciones del sabor, olor y textura (Fleet, 1990; Westall y Filtenborg, 1998b; Romano y col., 1989). En las salmueras, por otra parte, se favorece el crecimiento de especies halotolerantes (principalmente *Deb. hansenii*) (Seiler y Busse, 1990). Algunas levaduras presentes en queso excretan “killer factors” (factores letales) que son proteínas o glicoproteínas con un espectro antimicrobiano amplio; estos compuestos pueden tener efectos negativos sobre la elaboración y la calidad final del producto, por afectar a microorganismos de los cultivos iniciadores, pero también pueden ejercer efectos positivos al actuar contra enterobacterias, por ejemplo (Jakobsen y Narvhus, 1996).

También en yogures y otros productos lácteos como leche condensada pueden encontrarse levaduras contaminantes. Aunque algunas características de estos alimentos, como su bajo pH, baja actividad de agua o concentración elevada de azúcares, resultan favorables para el crecimiento de las levaduras (Suriyarachchi y Fleet, 1981, Fleet, 1990), determinadas condiciones de los procesos de elaboración, como el empleo de temperaturas superiores a 40°C para la fermentación del yogur, limitan la supervivencia de la mayoría de ellas (Suriyarachchi y Fleet, 1981, Fleet, 1990). En la elaboración de productos lácteos que contienen frutas, miel, frutos secos, azúcar, mermeladas o siropes

(sustratos y vehículos excelentes para las levaduras) es crítico el control higiénico de estos ingredientes y de las condiciones en las que se realiza su incorporación. En el yogur son frecuentes contaminantes las especies lactosa-fermentativas, como *K. lactis* o *K. marxianus* (que tienen cepas termotolerantes) (van der Walt y Johannsen, 1984), y sus formas imperfectas, *C. sphaerica* o *C. kefir*, además de *C. famata*, *C. krusei* o *C. lusitaniae* (Jakobsen y Narvhus, 1996). Las alteraciones causadas por levaduras en yogur son similares a las ya descritas en quesos (Suriyarachchi y Fleet, 1981; Fleet, 1990). En ocasiones la producción de gas es tan abundante que llega a provocar el hinchamiento y la rotura de los envases (Jakobsen y Narvhus, 1996).

Los estudios sobre contaminación por levaduras de instalaciones de la industria láctea, resaltan la frecuente y abundante presencia de *Deb. hansenii* en salmueras y maquinaria, que puede originar olores desagradables, y en menor medida la de *Torulaspora delbrueckii* que a menudo ha sido aislada de la superficie de quesos Feta y asociada con hinchamientos (Viljoen y Greyling, 1995; Westall y Filtenborg, 1998b).

5. 4. Rutas aerobias y anaerobias de utilización de lactosa

Aunque otros microorganismos producen sacaridasas extracelulares, para que las levaduras utilicen la lactosa es necesario que ésta atraviese primero la membrana plasmática, lo que se realiza mediante un sistema de transporte activo (Castillo, 1990), debido a la ubicación intracelular de la β -galactosidasa (Gekas y López-Leiva, 1985; Castillo, 1990; Bacci Junior y col., 1996).

El control del metabolismo de la lactosa se ejerce a nivel transcripcional, sobre varios genes incluidos en el llamado operón *LAC*² (Dickson y Markin, 1980; Barnett, 1981; Dickson y Barr, 1983; Castillo, 1990; Wésolowski-Louvel y col., 1996). Entre los genes *LAC* se incluyen el *LAC4* que codifica la β -galactosidasa, y el *LAC12* que codifica la lactosa permeasa. De los otros genes implicados en la utilización de la lactosa se sabe que los *LAC5*, *LAC8* y *LAC11*, ahora denominados *GAL7*, *GAL10* y *GAL1*,

² En levaduras, al contrario que en bacterias, los genes suelen designarse con letras mayúsculas.

respectivamente, codifican las enzimas que intervienen en la vía de Leloir, en la que la galactosa se fosforila y luego epimeriza a glucosa fosfato (Wésolowski-Louvel y col., 1996).

5. 4. 1. *Transporte*

El transporte de hexosas al medio intracelular en levaduras se realiza mediante difusión facilitada. D-glucosa, D-manosa y D-fructosa comparten la misma permeasa para atravesar la membrana plasmática, siendo este transportador constitutivo (Barnett, 1997). Las constantes cinéticas de transporte de glucosa parecen depender de su concentración en el medio: cuando la concentración de glucosa es baja, la afinidad del sistema de transporte es alta, y cuando, por el contrario, la concentración es alta, la afinidad disminuye. Este fenómeno sugiere la existencia de dos sistemas de transporte, uno constitutivo de baja afinidad y otro de alta afinidad, sujeto a represión catabólica por altas concentraciones de glucosa (Ciriacy y Reifengerger, 1997).

La galactosa también alcanza el medio intracelular mediante difusión facilitada, gracias a una permeasa específica de alta afinidad. Este transportador está codificado por el gen *GAL2*, cuya expresión es inducida por galactosa y reprimida por glucosa (Weusthuis y col., 1994). Recientemente se ha sugerido que podría existir otro sistema de transporte de galactosa que, al igual que el de la glucosa, sería constitutivo y de baja afinidad (Weusthuis y col., 1994).

Para las levaduras utilizadoras de lactosa, el transporte constituye el paso limitante para la utilización del azúcar, hasta el punto de que se han descrito algunas levaduras, incluyendo cepas de *S. verevisiae*, incapaces de utilizar la lactosa por carecer del sistema de transporte necesario para introducir este azúcar en la célula (Barnett, 1981; Castillo, 1990). *K. marxianus*, *K. lactis*, *C. kefir*, *Deb. hansenii* o *Deb. polymorphus* realizan un transporte activo contra-gradiente vía *protón-simporte* (cotransporte), gracias a la actuación de una permeasa específica (lactosa-permeasa), codificada por el gen *LAC12* (Cartwright y col., 1989). Este sistema asocia el transporte de una molécula de lactosa con

el de un H^+ . El flujo de H^+ es generado por una ATPasa adjunta a la membrana plasmática en el interior de la célula (van der Broek y van Steveninck, 1982; Weusthuis y col., 1994).

La lactosa-permeasa es un sistema de transporte saturable por lactosa, con características cinéticas muy variables según las especies (Tabla 11). Su regulación es compleja, y está gobernada por numerosos mecanismos de inducción/represión. Así, el transporte es inducible en presencia de lactosa en *K. lactis*, *K. marxianus*, *C. kefir* y *Deb. polymorphus* (Barnett y Sims, 1982; Pedrique y Castillo, 1982; Dickson y Barr, 1983; Boze y col., 1987) y también por galactosa en *K. lactis* (Dickson y Barr, 1983; Boze y col., 1987). La síntesis de lactosa-permeasa está sujeta a represión por glucosa en algunas especies como *K. lactis* y *C. kefir* (Dickson y Markin, 1980; Pedrique y Castillo, 1982; Dickson y Barr, 1983; Boze y col., 1987). En esta última especie se ha observado que también la galactosa puede ejercer dicho efecto (Pedrique y Castillo, 1982).

Tabla 11. Constantes de Michaelis (K_m) de la lactosa-permeasa de diversas especies de levaduras.

Levadura	K_m (mM)	Ref.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,2-1,5	(5,7)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	0,7-4	(1, 2, 3, 4, 6)
<i>Candida kefir</i>	0,01	(3)
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	0,28	(7)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mutada)	1	(2)

(1) Weusthuis y col. (1994); (2) Bisson y col. (1993); (3) Castillo (1990); (4) Boze y col. (1987); (5) Sims y col. (1984); (6) Dickson y Barr (1983); (7) Barnett y Sims (1982).

La presencia o ausencia de oxígeno influye en la utilización de disacáridos. Así, una levadura puede utilizar un disacárido en aerobiosis y perder esta capacidad en condiciones anaeróbicas. Este fenómeno recibe el nombre de **efecto Kluyver** (Barnett, 1981, 1992 y

1997; Gancedo y Serrano, 1989), y ha sido atribuido por algunos autores a una insuficiente disponibilidad energética (ATP) para mantener el transporte transmembrana de estos azúcares (Sims y col., 1984; Schulz y Höfer, 1986). *Deb. polymorphus* y algunas cepas de *K. marxianus* muestran este efecto para la lactosa, cuyo transporte puede reducirse hasta en un 90% (Schulz y Höfer, 1986).

La velocidad de utilización de la lactosa por levaduras depende pues de las condiciones de aireación y del tipo y concentración de los azúcares presentes, y estos mecanismos presentan variaciones según la especie y cepa de que se trate.

5. 4. 2. Hidrólisis

La β -galactosil-transferasa ó β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) abre a la lactosa el paso a la vía glucolítica, al hidrolizarla en sus dos monómeros constituyentes. Codificada por el gen *LAC4*, la síntesis de β -galactosidasa es inducible en presencia de lactosa o galactosa en *K. marxianus*, *C. kefir* y *K. lactis* (Davies, 1956; Dickson y Markin, 1980; Pedrique y Castillo, 1982). A su vez, está sujeta a represión catabólica por glucosa en *K. marxianus*, *C. kefir* y algunas cepas de *K. lactis* (Davies, 1956; Dickson y Markin, 1980; Pedrique y Castillo, 1982).

La K_m de esta enzima se ha estimado entre 1,18 y 3 mM para el orto-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG) y entre 10 y 33 mM para la lactosa, según las cepas (Biermann y Glantz, 1968; Sánchez y Castillo, 1980; Gonçalves y Castillo, 1982; Pedrique y Castillo, 1982; Castillo, 1990). Es de destacar que los valores de K_m para lactosa descritos para la lactosa-permeasa son inferiores a los publicados para la K_m de la β -galactosidasa.

Aunque la literatura coincide en general en que la localización de la lactasa en las levaduras es intracelular (Castillo, 1990), en algunas cepas de *K. marxianus* se han descrito indicios de localización de lactasa en la cara externa de la membrana plasmática (Carvalho-Silva y Spencer-Martins, 1990).

5. 4. 3. *Metabolismo intermediario*

Una vez hidrolizada la lactosa, la glucosa y la galactosa son fosforiladas antes de incorporarse a la vía glucolítica o de Embden-Meyerhof (EMP) (Figura 9). La hexoquinasa cataliza el paso de glucosa a glucosa-6-fosfato, para lo que requiere ATP y Mg^{2+} (Kockková-Kratochvílová, 1990; Entian, 1997). La galactosa es fosforilada por la galactoquinasa y transformada en glucosa-fosfato antes de integrarse en la ruta EMP (Gancedo y Serrano, 1989; Barnett, 1997), como se muestra esquemáticamente en la Figura 9.

En función de la disponibilidad de oxígeno, puede cambiar el destino del piruvato, metabolito final de la ruta EMP, con muy distinto resultado en cuanto a rendimiento energético. En presencia de oxígeno, la piruvato deshidrogenasa convierte el piruvato en acetil-CoA, que se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs, que en conexión con la cadena respiratoria genera ATP, CO_2 y H_2O . Ante una limitación de oxígeno, sin embargo, se activa la piruvato decarboxilasa que media el paso de piruvato a acetaldehído, luego convertible en etanol, con menor rendimiento de CO_2 y nula producción de energía y agua (Figura 9). No sólo la concentración de oxígeno encamina al piruvato por una u otra ruta; también influye en ello la cantidad de azúcares metabolizados, canalizados en la glucólisis. La piruvato deshidrogenasa tiene por el piruvato una afinidad 10 veces mayor que la piruvato decarboxilasa, por lo que capta preferentemente a este sustrato cuando su nivel es bajo, debido a un menor flujo glucolítico. Sin embargo, cuando este flujo aumenta, el piruvato se conduce en mayor proporción hacia la formación de etanol (Barnett, 1992; Hohmann, 1997).

Por lo que se refiere a la cadena de transporte electrónico, en las levaduras existen NADH deshidrogenasas localizadas en la superficie externa de la membrana mitocondrial que aceptan electrones del NADH o NADPH procedentes del exterior de la mitocondria, sin necesidad de un mecanismo especial (como en los organismos eucarióticos superiores) para transportar los coenzimas reducidos al interior de la mitocondria (Gancedo y Serrano, 1989; Alexander y Jeffries, 1990).

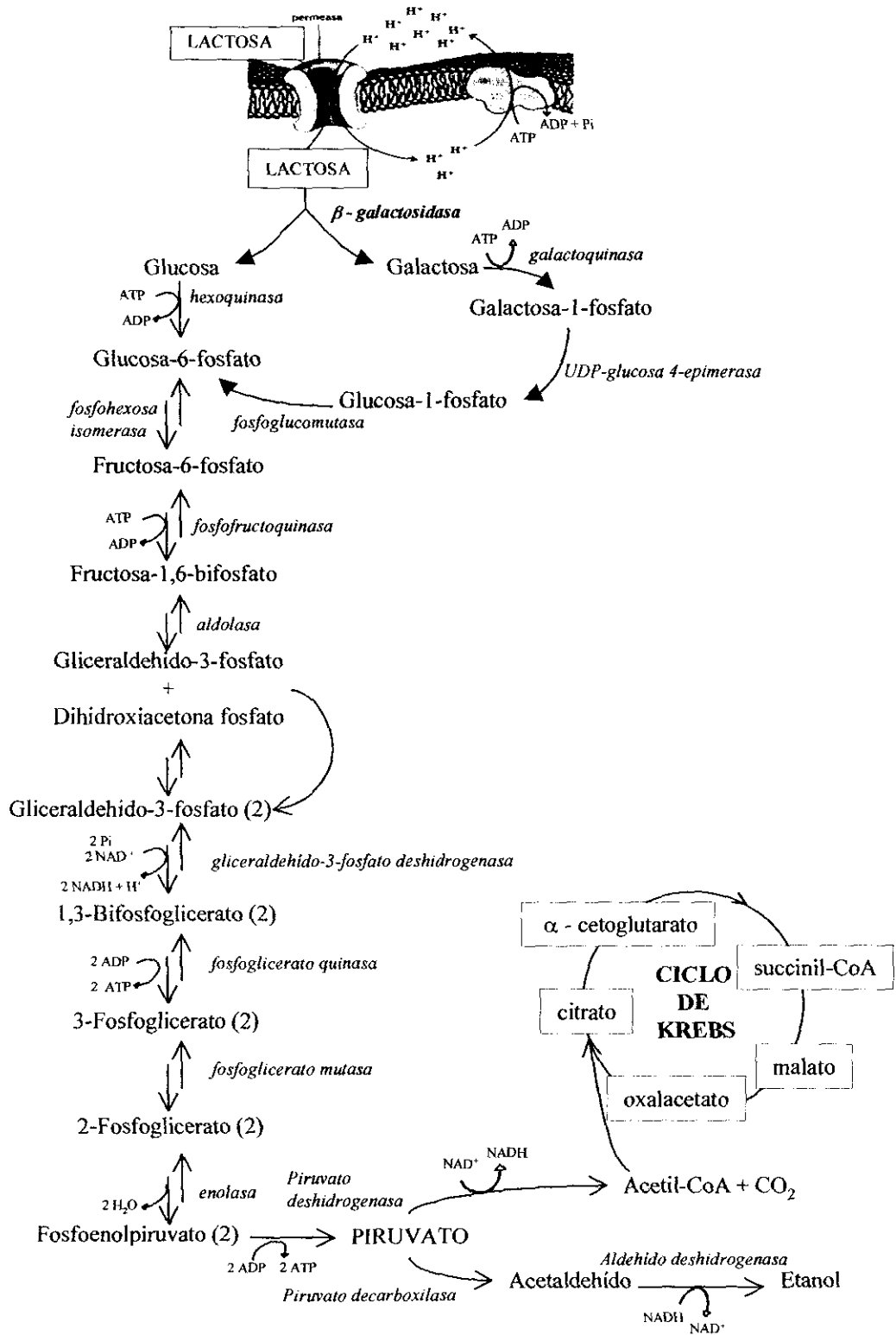


Figura 5. Rutas metabólicas de la lactosa

5. 4. 4. Utilización aerobia y anaerobia de azúcares en distintas levaduras

Como ya se ha indicado, el metabolismo de los azúcares sigue vías diferentes en función del oxígeno empleado por las levaduras. Como fermentación se considera al catabolismo anaerobio de azúcares a través de la vía glucolítica hasta piruvato y de ahí a etanol y CO₂. Las levaduras aerobias obligadas carecen de capacidad fermentativa; entre ellas se incluyen los géneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomycopsis* y *Sporobolomyces*, y algunas especies de otros géneros como *Deb. hansenii* o *Torulopsis candida* (Gancedo y Serrano, 1989; Wiebe Visser y col., 1990; Bunn y Poyton, 1996). Su metabolismo exclusivamente respiratorio ha sido atribuido a la ausencia de la alcohol deshidrogenasa (Gancedo y Serrano, 1989).

Entre las levaduras anaerobias facultativas, que sí poseen capacidad fermentativa, hay algunas cuyo metabolismo es mayoritariamente fermentativo: son las “aerobias fermentativas”, de las que *S. cerevisiae* es la especie más representativa. Otras poseen un metabolismo predominantemente respiratorio; son las “aerobias respiratorias”, entre las que se incluyen las especies *K. lactis*, *K. marxianus*, *C. kefir* y *Deb. polymorphus*, estudiadas a lo largo de este trabajo (Gancedo y Serrano, 1989; Alexander y Jeffries, 1990; Bunn y Poyton, 1996; González Siso y col., 1996).

La utilización de azúcares es mucho más efectiva energéticamente por vía respiratoria. Por ello, en presencia de oxígeno, se suele inhibir la vía fermentativa y se favorece la respiratoria. Este hecho recibió el nombre de **efecto Pasteur** por su descubridor (Kockková-Kratochvílová, 1990; Barnett, 1997). Existen, sin embargo, levaduras que incluso en presencia de oxígeno, utilizan la vía fermentativa para producir etanol. Este fenómeno se denomina **efecto Crabtree**, y fue inicialmente observado por este autor en células tumorales en 1929 (Deken, 1966a; Fiechter y col., 1981; Alexander y Jeffries, 1990; Kockková-Kratochvílová, 1990; Barnett, 1997). Las levaduras que producen etanol en condiciones aerobias, entre las que se encuentra *S. cerevisiae*, se consideran Crabtree-positivas. Una pequeña mutación, descrita por Ephurussi y col. (1949), denominada “petite” y responsable de la pérdida de la capacidad respiratoria, fue caracterizada posteriormente por Deken (1966b) como la expresión fenotípica del efecto Crabtree. Esta mutación incapacita a la célula para sintetizar algunas enzimas de la cadena

respiratoria y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, principalmente la citocromo *c* oxidasa, tipos *a* y *b*. Así, las levaduras Crabtree-positivas resultaron ser también “petite” positivas (Deken, 1966b; Alexander y Jeffries, 1990).

Las levaduras Crabtree-negativas producen etanol únicamente cuando el oxígeno es limitante (Deken, 1966a; Alexander y Jeffries, 1990; Kockková-Kratochvílová, 1990; Barnett, 1997). Dentro de este grupo se incluyen habitualmente *K. marxianus*, *K. lactis* y *C. kefir* (Inchaurredo y col., 1994). Algunos autores sitúan sin embargo a *K. lactis* como un caso intermedio entre las levaduras Crabtree negativas y las positivas (González Siso y col., 1996), porque en ocasiones, incluso con aireación intensa, se produce etanol en cantidades importantes. Este fenómeno, estudiado en *K. marxianus*, ha sido atribuido a un desequilibrio entre el flujo glicolítico y la capacidad respiratoria, que en ningún momento desaparece. Se ha sugerido que el exceso de piruvato producido al aumentar el flujo de lactosa, se desvía hacia la producción de etanol (Castrillo y Ugalde, 1993).

5. 5. Rutas de utilización de nutrientes nitrogenados

Al igual que otros microorganismos, las levaduras se caracterizan por utilizar preferentemente las fracciones de bajo peso molecular del material nitrogenado (amonio, aminoácidos, péptidos) presentes en los medios de cultivo, antes que las de alto peso molecular (polipéptidos, proteínas), previa hidrólisis (Kockková-Kratochvílová, 1990). En general, podemos decir que esta última fracción es la que predomina en los medios naturales procedentes de la industria alimentaria (sueros, maltas, mostos, etc.).

Todas las levaduras son capaces de utilizar el amonio del medio como fuente de nitrógeno empleando preferentemente glutamato deshidrogenasas para su asimilación (Cartwright y col., 1989). Se ha visto que en el caso de levaduras empleadas en panadería existen dos sistemas de transporte para el NH_4^+ , uno de baja y otro de alta afinidad (Bendeker y col., 1990). *S. cerevisiae* es además capaz de incorporar NH_4^+ al medio intracelular utilizando un sistema inespecífico de transporte que sirve para otros cationes monovalentes (Bendeker y col., 1990).

Por el contrario, no todas las levaduras pueden transportar nitratos al medio intracelular; por ello, esta característica se utiliza como criterio taxonómico. En levaduras, los nitratos atraviesan la membrana plasmática mediante un sistema activo, acoplado a la transferencia de H^+ en proporción 2:1; este sistema está sujeto a represión catabólica por iones amonio (Cartwright y col., 1989).

Los aminoácidos acceden al interior de la célula mediante un sistema general de transporte denominado GAP (General Amino-acid Permease). Este sistema, que sigue la vía protón-simporte, es más eficaz para el transporte de aminoácidos con conformación anomérica L que para los D (Large, 1986; Cartwright y col., 1989). Los iones NH_4^+ y el amoníaco del medio también ejercen un papel represor en la síntesis de esta permeasa inespecífica (Large, 1986). Además del sistema general, las levaduras poseen sistemas de transporte específicos que ya han sido caracterizados para 12 L-aminoácidos diferentes (Large, 1986; Cartwright y col., 1989).

Utilizando un sistema de transporte general parecido al anterior, las levaduras pueden incorporar péptidos de pequeño tamaño sin necesidad de hidrólisis. El número máximo de unidades aminoacídicas que componen un péptido capaz de ser transportado por este sistema, depende del tipo de cepa de que se trate. Aunque algunas cepas de *S. cerevisiae* pueden transportar péptidos constituidos por 5 unidades de metionina, en general, este sistema sólo opera para di y tripéptidos (Cartwright y col., 1989). La composición y secuencia aminoacídica de los péptidos influyen también en la eficacia de esta permeasa (Cartwright y col., 1989). Se sabe, por ejemplo, que el glutamato y el sulfato amónico actúan como inhibidores (Cartwright y col., 1989).

El material nitrogenado de alto peso molecular tan solo puede ser asimilado tras su hidrólisis. Algunas especies pertenecientes a los géneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporum* son capaces de producir proteasas extracelulares (Ahearn y col., 1968; Schmidt y col., 1979; Bilinski y Stewart, 1990). Sin embargo, otras levaduras como *S. cerevisiae* carecen de dicha habilidad (Bilinski y Stewart, 1990). Estas proteasas suelen en general ser termolábiles, son sintetizadas en la fase exponencial de crecimiento y su expresión está sujeta a factores nutritivos y otras

condiciones medioambientales (Bilinski y Stewart, 1990). Mecanismos de inducción y/o represión regulan la síntesis.

Las levaduras pueden utilizar los aminoácidos como fuentes de carbono y/o de nitrógeno (Large, 1986). Cuando los aminoácidos constituyen la única fuente de nitrógeno del medio, tres son las vías de utilización predominantes. Las tres se inhiben total o parcialmente en medios que contienen sales amónicas (Bendeker y col., 1990). Por la vía de Ehrlich, los aminoácidos son desaminados, decarboxilados y finalmente oxidados o reducidos. Dependiendo del tipo de aminoácido se obtienen por esta vía compuestos diferentes; así, a partir de valina, leucina e isoleucina se producen por reducción los denominados “fusel oils” (isobutanol, isopentanol y pentanol, respectivamente), de la alanina se obtiene etanol, del glutamato se produce succinato, etc. Si las levaduras crecen en un medio que contiene como única fuente de nitrógeno un solo tipo de aminoácido, los compuestos derivados pueden alcanzar concentraciones que ejercen un efecto tóxico más o menos pronunciado en la célula. Sin embargo, la toxicidad derivada del uso de un solo aminoácido se anula en presencia de otros aminoácidos; por ejemplo la valina bloquea el efecto tóxico de la leucina.

La segunda vía para la utilización general de aminoácidos se inicia con la transaminación, actuando el 2-cetoglutarato como aceptor del grupo amino, produciéndose glutamato. El amonio y el L-glutamato son los compuestos claves en el metabolismo nitrogenado de las levaduras. El glutamato, además de ser un producto de degradación de varios aminoácidos, actúa como precursor en la síntesis de otros, como prolina y arginina (Kockková-Kratochvílová, 1990). Es además un aminoácido mayoritario en suero de quesería y constituye una excelente fuente de nitrógeno para muchas levaduras (Bendeker y col., 1990). Se sabe que la concentración intracelular de glutamato en las levaduras permanece constante en medios que sólo contienen sales amónicas como fuente de nitrógeno, pero baja en presencia de otros aminoácidos (Kockková-Kratochvílová, 1990).

La tercera vía de degradación de aminoácidos (mecanismo de Stickland) sólo tiene lugar cuando en el medio se encuentran simultáneamente algunos de los aminoácidos donadores de H^+ (alanina, serina, valina, leucina, aspartato, glutamato, cisteína,

fenilalanina, histidina) junto con algún receptor de H^+ (glicina, ornitina, arginina, prolina, hidroxiprolina, triptófano), asociándose una reacción de óxido-reducción con la desaminación de ambos tipos de sustratos de la reacción (Kockková-Kratochvílová, 1990).

5. 6. Floculación de levaduras

Las levaduras tienen una pared celular que, al contrario que las bacterias, no posee peptidoglucanos (Reiss, 1985). Es una pared relativamente rígida, laminada, responsable de la morfología característica de las células, que actúa como barrera metabólica, permitiendo solo el paso de compuestos de bajo peso molecular (Reiss, 1985). Los principales componentes de la pared celular son polisacáridos, entre cuya trama se ubican diversos tipos de enzimas hidrolíticas (invertasa, melibiasa, fosfatasa ácida, etc.). Los polisacáridos intervienen en la interacción entre células, particularmente en la floculación, y en sus características antigénicas (Kockková-Kratochvílová, 1990).

Además de polisacáridos (más del 60%), la pared incluye proteínas (13%), lípidos (8,5%) y otros constituyentes menores como DNA, RNA, esteroides y enzimas hidrolíticas (Kockková-Kratochvílová, 1990). Entre los polisacáridos hay homopolisacáridos (glucanos, quitina y mananos) y heteropolisacáridos (galactomananos, fucomananos, xilomananos y arabomananos) (Kockková-Kratochvílová, 1990). Los glucanos se encuentran formando un complejo insoluble con la quitina y constituyen la matriz de la pared celular (Reiss, 1985). Aunque los polisacáridos de la pared son muy heterogéneos, predominan los polímeros lineales que se asocian para formar fibrillas parcialmente cristalizadas, impartiendo así rigidez a la pared. A pesar de que la quitina es un componente minoritario de la pared celular, en algunos casos como *S. cerevisiae* puede llegar a suponer el 1% de su peso seco (Reiss, 1985). Su contenido aumenta en la pared celular cuando las levaduras pasan de la forma celular a micelial, una transformación característica y fundamental de las levaduras patógenas (Reiss, 1985; Kockková-Kratochvílová, 1990). Los mananos están constituidos por una familia de polímeros de manosa, se encuentran embebidos en la matriz de glucano-quitina, y forman uniones

covalentes con las proteínas. La cantidad de polisacárido por célula depende de la fase de crecimiento de la levadura y su estructura, de la especie. Ciertas cadenas laterales de los mananos les confieren propiedades antigénicas (Kocková-Kratochvílová, 1990).

Las células de algunas levaduras se aglomeran gracias a la interacción entre distintos componentes de la pared celular, para formar agregados celulares denominados *flóculos*, que se separan espontáneamente del medio en forma de sedimento o de película superficial. La floculación es un fenómeno muy apreciado industrialmente porque ahorra en gastos de separación.

Los iones de calcio tienen un papel en los mecanismos de floculación y su eliminación del medio inhibe el proceso (Stratford y Assinder, 1991). Durante muchos años se mantuvo el modelo de los *puentes de calcio*, como principales responsables de la floculación, uniendo directamente determinadas proteínas y polisacáridos de la pared celular (Harris, 1959; Mill, 1964). En los últimos años sin embargo, va adquiriendo mayor importancia la teoría basada en las interacciones entre los mananos y las lectinas de las levaduras (glicoproteínas con gran afinidad por determinadas secuencias glicosídicas). Según esta hipótesis, propuesta por Miki y col. (1982a), la aglutinación se produce al interaccionar los polisacáridos extracelulares de una célula con las lectinas de la pared celular de células vecinas, con la ayuda del Ca^{2+} que actúa como co-factor. Los flóculos suelen formarse sobre todo durante las últimas fases de crecimiento, coincidiendo con el agotamiento de nutrientes (Bony y col., 1998; Calleja, 1987; Stratford y Assinder, 1991). No se forman lectinas en las cepas no floculantes (Esser y Kües, 1983). La capacidad floculante está regulada genéticamente, conociéndose hasta 12 genes implicados (Miki y col., 1982a y 1982b; Calleja, 1987; Stratford y Assinder, 1991). Entre ellos, el más caracterizado es el gen dominante *FLO1* (Miki y col., 1982a; Stratford y Assinder, 1991; Watari y col., 1991; Bony y col., 1998) que ha sido aislado, secuenciado (Watari y col., 1994) y transferido a cepas no floculantes para conferirles esta propiedad (Watari y col., 1991). El gen codifica la proteína Flo1p, de estructura similar a la de las lectinas de plantas y localizada en la pared celular (Watari y col., 1994). La expresión fenotípica de la floculación es muy inestable y está influida por numerosos factores del medio (Calleja, 1987), como la presencia/ausencia de determinados azúcares y sales (imprescindible la

presencia de Ca^{2+}) (Hussain y col., 1986; Calleja, 1987; Stratford, 1989b; Stratford y Pearson, 1992), el pH (Calleja, 1987), la temperatura (Calleja, 1987; Fernandes y col., 1993) y la agitación (Calleja, 1987; Stratford, 1989a).

5. 7. Procesos de bioconversión utilizando levaduras

La fermentación de la lactosa del suero ha permitido desde hace varias décadas la producción industrial de biomasa, etanol, β -galactosidasa y otros productos.

La utilización de levaduras para obtener **biomasa** con gran riqueza proteica, también denominada SCP (Single Cell Protein), utilizando suero como medio de cultivo, es una práctica industrial iniciada hace más de 50 años (Castillo, 1990; Kilara y Patel, 1992; Mawson, 1994; González Siso, 1996).

Para producir biomasa se puede cultivar directamente en suero o permeado una especie utilizadora de lactosa, como *K. marxianus*, *K. lactis*, *C. kefir*, *C. intermedia* o *Torulopsis cremori* (Vananuvat y Kinsella, 1975; Mahmoud y Kosikowski, 1982; Bayer, 1983; Shay y Wegner, 1986; Michel y col., 1987; El-Samragy y Zall, 1988; Castillo, 1990; Kilara y Patel, 1992; Mawson, 1994; Ben-Hassan y Ghaly, 1995; Cristiani-Urbina y col., 1997), o hidrolizar la lactosa, para facilitar el crecimiento de especies como *S. cerevisiae* (Castillo, 1990). También se ha descrito el empleo de cultivos mixtos, en los que levaduras o bacterias lactasa-positivas facilitan el crecimiento de otros microorganismos incapaces de utilizar la lactosa, como *Torulopsis bovina* (Moulin y col., 1983b; Reinbold y Takemoto, 1988; Kilara y Patel, 1992; Kallel-Mhiri y col., 1994; González Siso, 1996).

El cultivo puede ser discontinuo o en *batch*, aunque los principales procedimientos industriales ya desarrollados han optado por sistemas en continuo o semi-continuo, como es el caso del proceso “Bel” (a base de *K. marxianus*) , el “Kiel” (con *Candida krusei* utilizando el lactato generado por *Lactobacillus bulgaricus*) y el “Viena” (con *C. intermedia*) (Kilara y Patel, 1992; González y col., 1993; Mawson, 1994; González Siso, 1996).

Para optimizar la producción de biomasa es necesario regular parámetros como la temperatura (generalmente se utilizan 30°C; Mahmoud y Kosikowski, 1982; Castillo, 1990) y el pH (rangos entre 2 y 6, que además previenen el crecimiento de otros microorganismos; Michel y col., 1987; Castillo, 1990; Mawson, 1994).

Los microorganismos empleados no son en general capaces de asimilar ni las proteínas ni muchos de los péptidos del suero (tan sólo utilizan aproximadamente un 25% del nitrógeno total) (Wasserman, 1960; Castillo, 1990; González Siso, 1996), por lo que generalmente se emplean como sustrato los sueros desproteinizados o los permeados, tras aprovecharse las seroproteínas. Las necesidades de suplementación de N y/o de P (Harju y col., 1976; Castillo y col., 1979; Castillo, 1990; González Siso, 1996), o de otros elementos traza (Bayer, 1983) dependen de la cantidad y peso molecular del material peptídico residual. Determinados suplementos vitamínicos han sido también empleados para acelerar el rendimiento proteico de la biomasa (Castillo y De Sánchez, 1978; Harju y col., 1976; Castillo, 1990).

El principal parámetro limitante y de control es el aporte de oxígeno, del que dependen los efectos Kluyver y Pasteur, para mantener el metabolismo respiratorio de las levaduras y evitar la producción de etanol que acabaría inhibiendo el crecimiento de las levaduras (Gholson y Gough, 1980; Moulin y col., 1981; Castillo, 1990; Ghaly y col., 1993; Mawson, 1994). Por este motivo es aconsejable el empleo de levaduras Crabtree-negativas para la producción de SCP (Moulin y col., 1983a).

La biomasa debe ser recuperada del caldo de cultivo, lo que generalmente se realiza por centrifugación o sedimentación; también se puede evitar la centrifugación secando el caldo de fermentación completo (Castillo, 1990; Kilara y Patel, 1992; Mawson, 1994; González Siso, 1996). Obviamente, el empleo de cepas antes-floculantes es, como ya se ha mencionado previamente, claramente ventajoso (Banat y col., 1998).

La biomasa de levaduras posee excelentes propiedades nutritivas, un alto porcentaje proteico y una adecuada proporción de aminoácidos esenciales (Shay y Wegner, 1986; Michel y col., 1987; El-Samragy y col., 1988; De Felice y Scioli, 1994), además de ser abundantes las vitaminas del grupo B (Michel y col., 1987). La proporción de lisina en la

proteína es superior a la establecida en la proteína de referencia de la FAO; como el contenido en metionina es algo deficiente, se recomienda complementar la proteína de levaduras con proteína de cereales (Michel y col., 1987). Actualmente, se están desarrollando cepas mutantes de *K. lactis* enriquecidas en metionina (Kitamoto y Nakahara, 1994), para mejorar las características nutricionales de la correspondiente biomasa. La proteína unicelular de levaduras se destina en su mayor parte a la fabricación de piensos (Mawson, 1994), pues para que la biomasa pueda ser utilizada en alimentación humana es imprescindible el uso de especies admitidas como seguras (GRAS). En cuanto al equilibrio de ácidos nucleicos, el RNA suele ser en levaduras unas 5 veces más abundante que el DNA (Michel y col., 1987). Las levaduras son excelentes fuentes de ribonucleótidos y otros valiosos componentes celulares de uso alimentario. Por fermentación aeróbica de *K. marxianus* en suero y posterior lisis celular, se pueden obtener 5'-ribonucleótidos, que se utilizan como aditivos potenciadores del sabor en sopas, salsas, tentempiés, aderezos, zumos, hamburguesas, pescados y quesos (Belem y Lee, 1997 y 1998). Incluso se emplean los extractos de levadura procedentes del autolizado sin refinar para mejorar el sabor de productos cárnicos (Jiménez y col, 1998). También se pueden obtener de manera similar polisacáridos derivados de la pared celular (mananos y glucanos) que se utilizan como vehiculantes de aromas y estabilizantes en alimentación animal (Belem y Lee, 1998). En alimentación humana se usan como gomas, y en otras industrias se utilizan para obtener pegamentos, detergentes, espumas, biofloculantes, cosméticos, entre otros. En quesos, los polisacáridos de levaduras incrementan los rendimientos, ya que al servir como aglomerantes de las proteínas, reducen sus pérdidas (Belem y Lee, 1998; Sheu y col., 1998). También se pueden obtener de las levaduras oligosacáridos para su uso como ingredientes probióticos en alimentación animal y humana.

La producción de levaduras de panadería no convencionales es otra de las posibilidades del cultivo en sueros. *K. marxianus* se ha estudiado como posible levadura de panadería (Caballero y col., 1995). Las propiedades que confiere a las masas dulces y pan son similares a las habitualmente debidas a *S. cerevisiae*, que también ha sido cultivada en suero hidrolizado (Castillo, 1990).

En los cultivos para obtención de biomasa se han alcanzado rendimientos de hasta el 50% de biomasa en peso seco (respecto a la lactosa presente) con un contenido proteico de hasta el 50% (Moulin y col., 1983b; Michel y col., 1987; González Siso, 1996), aunque en la mayoría de los resultados descritos los rendimientos suelen ser inferiores (Michel y col., 1987; El-Samragy y Zall, 1988).

El grupo de González y col. (1993) ha realizado estudios sobre la viabilidad económica de la obtención de biomasa a partir de suero en queserías españolas, concluyendo que resulta rentable la producción en continuo en fábricas que obtengan más de 40.000 L de suero/día.

El aprovechamiento de la lactosa y otros componentes durante la producción de biomasa proteica también tiene como consecuencia el descenso de la carga contaminante del suero: tras periodos de cultivo que oscilan desde unas pocas horas hasta 1 ó 2 días, la DQO y la DBO₅ presentan valores que oscilan entre el 60 y el 90% del valor inicial (Mickle y col., 1974; Vananuvat y Kinsella, 1975; Gilliland, 1979; Gholson y Gough, 1980; Moresi y col., 1980b; Bayer, 1983; Maiorella y Castillo, 1984; Reinbold y Takemoto, 1988; Castillo, 1990; González y col., 1993; De Felice y Scioli, 1994; Harden, 1996). El modo de recuperación de la biomasa determina también la cantidad y calidad del residuo; por ejemplo, el secado de la totalidad del caldo de fermentación minimiza los residuos, pero la biomasa así obtenida tiene un contenido mayor en sales (Mawson, 1994). Cuando se separan las levaduras del caldo por centrifugación, la eficiencia en cuanto a disminución de la materia orgánica en el líquido residual puede ser similar a la obtenida por depuración anaerobia del suero, con una reducción de la DBO de más del 90% (Mawson, 1994).

La fermentación de la lactosa para producir **etanol** es otra importante vía para el aprovechamiento de sueros y sus derivados cultivando levaduras. Generalmente, en su producción se han empleado levaduras lactosa-positivas, siendo los géneros *Kluyveromyces* y *Candida* los que poseen mayor capacidad de producción (Kilara y Patel, 1992; Mawson, 1994; Banat y col, 1998). Utilizando cepas de *K. marxianus*, ya existen varias destilerías distribuidas por diversos países como Irlanda, EEUU y Nueva Zelanda,

que producen etanol a partir de suero (Castillo, 1990; Mawson, 1994). Este último país destina el 50% de su producción para obtener etanol (Mawson, 1994).

También se ha usado con este fin la especie *S. cerevisiae*, cultivando en sueros y permeados con la lactosa hidrolizada (O'Learly y col., 1977a y 1977b; Kosaric, 1996), o en mezclas de estos hidrolizados con otros residuos sólidos o líquidos (Henning, 1998; Kumar y col., 1998). Ya que este microorganismo representa uno de los de primera elección para la producción industrial de etanol (Fiechter y col., 1981), son varios los trabajos en los que se describe la obtención de cepas recombinantes de *S. cerevisiae* capaces de fermentar directamente la lactosa del suero (Porro y col., 1992; Ramakrishnan y Hartley, 1993; Compagno y col., 1995).

La producción de etanol se puede llevar a cabo tanto en fermentaciones en continuo (González Siso, 1996; Banat y col., 1998) como en cultivos discontinuos. La inmovilización de levaduras permite por otra parte mejorar los rendimientos (González Siso, 1996). Como soportes para la inmovilización se utilizan principalmente alginatos de Na y Ca que proporcionan una excelente retención de *K. marxianus* (King y Zall, 1983; Marwaha y Kennedy, 1984; Marwaha y col., 1988a; Singh y col., 1998).

Tanto en los sistemas con células libres como en los inmovilizados, una cierta aireación es factor importante en el proceso, ya que si bien la fermentación alcohólica tiene lugar en anaerobiosis, algo de oxígeno es necesario para la síntesis de esterol y de los ácidos grasos insaturados esenciales en la estructura de la membrana plasmática (Nagashima, 1990). La optimización de este aspecto ha sido estudiada por varios autores en *K. marxianus* y *C. kefir* y, concluyendo que niveles de microaireación del orden de 0,1 v.v.m. son los que rinden mejores producciones (Varela y col., 1992; Ghaly y El-Taweel, 1995a).

Como en el caso de la obtención de biomasa, la concentración de lactosa es un factor importante para la producción de etanol; para obtener un buen rendimiento se necesita una concentración de lactosa superior a los 100 g/L, lo que supone concentrar el suero al menos 2 ó 3 veces, pues el suero sin concentrar rinde niveles de etanol bajos que encarecen la destilación (Vienne y von Stockar, 1985; Mawson, 1994; Ghaly y El-Taweel,

1995b; González Siso, 1996). Niveles de sustrato demasiado elevados (superiores al 20-25% de lactosa) pueden llegar no obstante, a inhibir el crecimiento celular, por las desfavorables condiciones de elevada presión osmótica y baja actividad de agua que originan (Ghaly y El-Taweel, 1995b).

Las altas concentraciones de etanol, dependientes en gran medida de la concentración de lactosa, también provocan la inhibición del crecimiento (Singh y col., 1998), por lo que es necesario regular el sistema de alimentación. En cepas muy tolerantes, el crecimiento comienza a inhibirse a concentraciones de etanol superiores a los 20 g/L (Ghaly y El-Taweel, 1995b). Aunque la suplementación de los sueros mejora la producción de biomasa, para la producción de etanol ésta parece ser innecesaria (Castillo, 1990).

La generalidad de los procesos de fermentación con levaduras lactasa-positivas tienen lugar a temperaturas no superiores a 37°C (Singh y col., 1998). Sin embargo, a veces se recurre al empleo de cepas capaces de proliferar a 45°C, temperatura que favorece la recuperación parcial (por evaporación) del etanol producido, impidiéndose así que alcance niveles inhibitorios para el crecimiento de las levaduras empleadas. Así se han empleado cepas termotolerantes de *K. marxianus* capaces de producir etanol a partir de suero (D'Amore y col., 1989; Hack y Marchant, 1998; Singh y col., 1998).

Tras la fermentación, el etanol se separa del medio por destilación. Las proporciones de este alcohol que se obtienen en la fermentación de *K. marxianus* o *C. kefir* representan rendimientos superiores al 80% del valor teórico, que es de 0,53 g de etanol/g de lactosa (Vienne y von Stockar, 1985; Varela y col., 1992; Mawson, 1994; Ghaly y El-Taweel, 1995a), agotándose más del 90% de la lactosa inicial (Castillo, 1990; Mawson, 1994; González Siso, 1996).

Tras la eliminación de células y la destilación de los sueros o permeados fermentados para la obtención de etanol, se pueden conseguir reducciones de la DQO cercanas al 90% (Reesen y Strube, 1978; Singh y col., 1983; Maiorella y Castillo, 1984; Castillo, 1990). Por lo tanto, también en este caso, como en el de obtención de biomasa, se obtienen dos beneficios, producto y mejoras medioambientales.

La obtención a partir de suero de otros derivados alcohólicos directamente utilizables como vinos, cervezas o cavas también ha sido descrita en la literatura, empleando el suero como suplemento, o como único sustrato para la fermentación (Roland y Alm , 1975; Kilara y Patel, 1992; Henning, 1998).

Otra importante vertiente del cultivo de levaduras (generalmente *K. marxianus*) en sueros o permeados es la obtención de **enzimas**; se trata fundamentalmente de β -galactosidasa, aunque también se ha intentado obtener inulasa (Hewitt y GrootWassink, 1984; Guirand y Galzy, 1990), y poligalacturonasa (Schwan y Rose, 1994) La producción de lactasa a partir de levaduras se detalla en el apartado 6. 1.

La bioconversión de la lactosa y otros componentes del suero mediante levaduras permite la obtención de **diversos bioproductos** generalmente de mayor valor añadido que la biomasa o el etanol. Se obtienen así vitaminas, como riboflavina, a partir del cultivo en suero de *C. guilleirmondi* (Hobman, 1984) y ácido L-ascórbico, por acción de la L-galactonolactona oxidasa, secretada por *C. norvengensis* durante su cultivo en suero hidrolizado (Karam y Nicell, 1997).

También se obtiene glicerol, cultivando determinadas especies de los géneros *Candida* y *Kluyveromyces* en permeado suplementado con NaSO_3 , compuesto que desvía el paso del acetaldehído a etanol hacia la formación a glicerol (Jenq y col., 1989; Rapin y col., 1994). Esta podría ser una alternativa interesante desde un punto de vista económico, que puede competir con la obtención de glicerol por síntesis química a partir de derivados del petróleo (Jenq y col., 1989).

La gran variedad de compuestos volátiles que producen levaduras como *K. lactis* o *K. marxianus* durante la fermentación en medios ricos en azúcares (Fabre y col., 1995; Jiang, 1995), podría aprovecharse para la obtención de aromas florales y afrutados, empleables como aditivos, empleando como medios de cultivo sueros, con o sin hidrólisis previa.

También se puede obtener de la fermentación del suero aceites combustibles, derivados del cultivo de *C. curvata* o *Trichosporum cutaneum* (Castillo, 1990; Kilara y Patel, 1992), y carotenoides, empleando *Rhodothorula glutinis* (Frengova y col., 1994).

Como hemos visto, las levaduras utilizan parte de los nutrientes en los sueros para transformarlos en otros de mayor valor añadido, y permiten rebajar la carga contaminante de los efluentes. La producción de otros productos distintos de biomasa o etanol, como ácidos orgánicos, también reduce la DQO aunque generalmente en menor proporción (Sorlini y col., 1993; González Siso, 1996).

También se han utilizado las levaduras estrictamente para depurar efluentes lácteos, consiguiendo reducir la DQO en proporción próxima al 90% (Marwaha y col., 1988b y 1989). Un parámetro que, de no ser controlado, puede causar algún problema de contaminación por los correspondientes medios gastados puede ser el pH, ya que el cultivo de las levaduras acidifica en general los medios (Ghaly y Singh, 1989). Los medios de cultivo restantes una vez separadas las células o productos valorizables todavía presentan valores de DQO considerables (4.000-5.000 mg/L) lo que puede implicar la necesidad de aplicar un tratamiento de depuración antes de su descarga. El cultivo de levaduras debe pues considerarse como un *pretratamiento* más que como un tratamiento definitivo. Por último, hay una ventaja del cultivo de levaduras sobre el de mohos o bacterias: la no producción de metabolitos secundarios que puedan antagonizar a los microorganismos implicados en los tratamientos de depuración.

6. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES INDUSTRIALES DE LACTASA

6. 1. Características de la enzima de diversas fuentes. Formas comerciales

La β -D-galactosidasa o β -galactosil-transferasa (lactasa, EC 3.2.1.23) es una enzima que, sin ser frecuente, puede encontrarse en muy distintos tipos de seres vivos (existe en algunas plantas, animales, bacterias, mohos y levaduras) (Shukla, 1975). Entre las levaduras, se ha estimado que aproximadamente un 15% de las especies conocidas son lactasa positivas; los géneros más destacados en este sentido ya se mencionaron en la Tabla 9 (sección 5.1.). Entre los mohos es característica la producción de lactasa en varias especies de los géneros *Neurospora*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Scopuloriopsis* y *Curvularia* (Gekas y López-Leiva, 1985). En lo que respecta a bacterias, son lactasa-positivas muchas enterobacterias, incluyendo algunos géneros completos

(*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Yersinia*) y determinadas especies de otros (*Shigella*, *Salmonella* y *Hafnia*), la mayor parte de las bacterias lácticas, y ciertas especies de los géneros *Halomonas* sp., *Thermus* sp. y *Bacillus* sp. (Gekas y López-Leiva, 1985; Bergey's Manual, 1994).

Aunque el resultado más simple y conocido de la lactasa es la hidrólisis del disacárido, esta enzima es realmente una galactosil-transferasa, pudiendo ceder el residuo transferido al agua (lo que correspondería a la hidrólisis de la lactosa) o a otros azúcares (lo que conduce a la síntesis de oligosacáridos) (Shukla, 1975; Gekas y López-Leiva, 1985; Rouwenhorst y col., 1989; Pivarnik y col., 1995). El mecanismo general de la reacción de hidrólisis mediante esta enzima se muestra esquemáticamente en la Figura 10. Como puede verse, el sitio activo de la enzima tiene un grupo sulfihidrilo y otro imidazol, a los que se une la lactosa. Del complejo enzima-lactosa, se libera primero la glucosa y luego la galactosa, gracias a una molécula de agua que cede el H^+ al grupo $-SH$ de la enzima y el OH^- al C-1 de la galactosa.

Quien puso nombre a la lactasa fue Beijerinck, quien en 1889 obtuvo un extracto de células que fermentaban lactosa, procedente de un cultivo de levaduras a las que denominó *Saccharomyces kefir* (ahora *Kluyveromyces marxianus*). El efecto hidrolítico de la enzima, sin embargo, fue caracterizado más tarde (1894) por Fischer (Rouwenhorst y col., 1989).

Extensamente estudiada en *E. coli* (donde Jacob y Monod describieron el operon *lac* en 1961), su actividad se evidencia generalmente con un sustrato artificial denominado *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), que tras la hidrólisis libera nitrofenol, amarillo, detectable colorimétricamente. Menos empleadas son otras técnicas colorimétricas, cromatográficas o crioscópicas, que utilizan el sustrato natural y miden los monosacáridos liberados (Dahlqvist, 1984; Pivarnik y col., 1995). Cuando la enzima se encuentra ubicada intracelularmente (caso de levaduras y bacterias), el ONPG debe atravesar la membrana plasmática para ser hidrolizado; el paso de esta barrera es lento debido a la baja afinidad que tiene por este sustrato la permeasa implicada en el transporte de la lactosa (Flores y col., 1994; Dickson y Markin, 1980). Esto limita el acceso del sustrato a la lactasa, por lo que, antes de ensayar esta actividad, es frecuente someter a las

levaduras a tratamientos físicos o químicos, para extraer la enzima o para aumentar la permeabilidad de la membrana al ONPG.

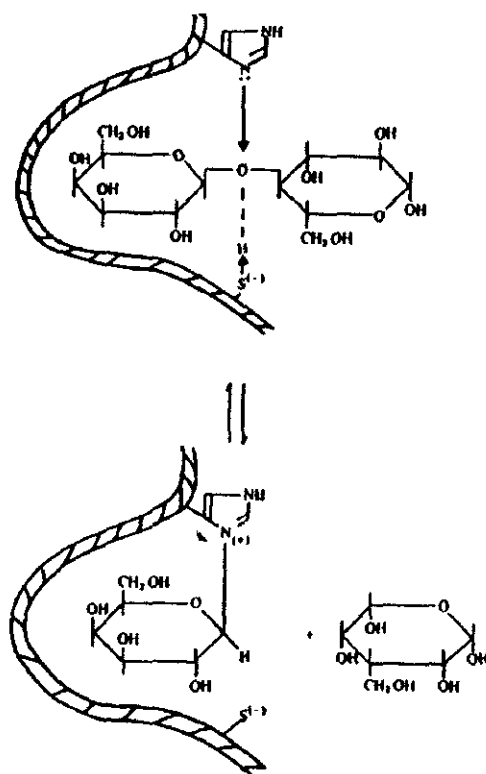


Figura 10. Mecanismo de acción de la β -D-galactosidasa.

Como ya se ha indicado, la lactasa puede diferir en su localización; los mohos la secretan extracelularmente, mientras que en levaduras y bacterias se encuentra confinada intracelularmente (Shukla, 1975; Gekas y López-Leiva, 1985; Castillo, 1990; Zadow, 1992). Los solventes orgánicos (cloroformo, tolueno, etanol, o combinados) han sido empleados frecuentemente como agentes permeabilizantes para levaduras y bacterias, generalmente a concentraciones del 2% (v/v) (Serrano y col., 1973; Mahoney y col., 1974; Fenton, 1982; Declaire y col., 1987; Champluvier y col., 1988; Flores y col., 1994; Siso y col., 1994; Stred'anský y col., 1993); también se emplean para este fin detergentes, como

Tween 80, Oxgall, Brij 35, Triton X-100, SDS, (sodio dodecil sulfato) o CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Flores y col., 1994; Somkuti y Steinberg, 1994; Bachhawat y col., 1996) o surfactantes como la digitonina (Joshi y col., 1989). Como método enzimático se ha ensayado la utilización de glucanasas, que destruyen la pared y propician la lisis celular (Zomer y col., 1987). Como métodos físicos se ha empleado la ruptura celular por cizalla (Schütte y Kula, 1988), la sonicación (Decleire y col., 1987), y la ruptura por determinados procedimientos de congelación (Flores y col., 1994).

En el ámbito comercial la β -D-galactosidasa se obtiene generalmente a partir de determinadas levaduras o mohos, en las que la propia célula o esta enzima está autorizada para el consumo humano o animal por estar incluida en las listas de sustancias “Generalmente Reconocidas como Inocuas” (GRAS) de los Estados Unidos (FDA, 1984; Gekas y López-Leiva, 1985; Kilara y Patel, 1992; Zadow, 1992; Galarraga y Rocandio, 1997). Las especies más utilizadas como fuente enzimática son *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *C. kefir* (Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992; Pivarnik y col., 1995). Se obtiene también a partir de *E. coli*, pero su uso está limitado a aplicaciones analíticas, no estando autorizado su empleo en alimentos (Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985). Otros microorganismos de los que se obtiene lactasa son algunas bacterias lácticas (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*) (Shukla, 1975; Galarraga y Rocandio, 1997; Axelsson, 1998) y determinadas especies del género *Bacillus* (Mozaffar y col., 1985; Gekas y López-Leiva, 1985; Pivarnik y col., 1995).

La lactasa puede estar constituida por una o varias subunidades; mientras que *E. coli* posee 4 subunidades (Richmond y col., 1981), se han encontrado de 9 a 10 en *K. marxianus* (Mahoney y Whitaker, 1978); y 2 idénticas en *K. lactis* (Cavaille y Combes, 1995). El peso molecular varía dependiendo de la fuente, entre 90 Kdaltons en *A. oryzae*, 201 Kda en *K. marxianus* y 850 Kda en determinadas cepas de *E. coli* (Shukla, 1975; Mahoney y Whitaker, 1978; Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985; Fenema, 1996). Los intervalos óptimos de pH varían según el origen y las demás condiciones de reacción (Shukla, 1975; Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985). Las variantes procedentes de levaduras o bacterias son más activas a pH neutro (6,5 – 7) y

temperaturas de entre 35 y 40°C, por lo que están indicadas para el uso en leche y sueros dulces. Las de origen fúngico, sin embargo, operan mejor a pH ácido (2,5 – 6) y temperaturas superiores a los 50°C, y por ello son más adecuadas para el tratamiento de sueros ácidos (Shukla, 1975; Geikas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992; Cavaille y Combes, 1995; Pivarnik y col., 1995). Las enzimas de *K. marxianus*, *K. lactis* y *C. kefir* suelen requerir la presencia de algunos cofactores catiónicos, Mn^{++} , K^+ , Na^+ o el Mg^{++} según las especies (Davies, 1964; Wendorff y Amundson, 1971; Sonawat y col., 1981; Castillo, 1990; Cavailles y Combes, 1995), y se inhiben en presencia de metales pesados (Wendorff y Amundson, 1971; Itoh y col., 1982; Castillo y Moreno, 1983; Pivarnik y col., 1995). En cambio, las enzimas de *A. niger* y *A. oryzae* parecen menos dependientes de iones activadores (Pivarnik y col., 1995). Las enzimas de ambas fuentes se inhiben competitivamente por galactosa y no competitivamente por glucosa (Wendorff y Amundson, 1971; Gekas y López-Leiva, 1985; Cavailles y Combes, 1995; Pivarnik y col., 1995). La elección de un tipo u otro de enzima y su rendimiento, dependen pues, del medio en que se pretenda hidrolizar la lactosa y de las condiciones de pH y temperatura allí presentes (Gekas y López-Leiva, 1985; Pivarnik y col., 1995). Para la mayoría de las aplicaciones comerciales se considera aceptable un porcentaje entre un 75 y 85% de hidrólisis de lactosa (Prenosil y col., 1987b; Coton, 1980).

La producción industrial de organismos fuente de lactasa casi siempre se ha realizado mediante cultivos sobre subproductos líquidos de la fabricación de alimentos, por ejemplo de productos lácteos (sueros, mazadas, etc.) (González Siso, 1996). Un equipo de la Universidad de La Coruña ha probado a emplear un sustrato sólido (maíz molido y salvado de trigo), en combinación con suero desproteinizado concentrado, para la producción de lactasa de *K. lactis* (Becerra y González Siso, 1996).

En los cultivos de levaduras en suero para la producción de β -galactosidasa, es frecuente la suplementación con fuentes de nitrógeno, fósforo, minerales traza y/o vitaminas para mejorar el rendimiento de enzima (Wendorff y col., 1970; Bales y Castillo, 1979; Barbosa y col., 1985; Sánchez y Castillo, 1980; Castillo, 1990). Además, los óptimos de temperatura (20 – 28°C) y pH (3 – 4,5) para obtener el máximo de lactasa suelen ser inferiores a los empleados en la obtención de biomasa (Wendorff y col., 1970;

Sánchez y Castillo, 1980; Castillo, 1990). Asimismo, se recomienda que la concentración de lactosa empleada como fuente de carbono para la levadura sea en este caso cercana al 15% (Wendorff y col., 1970; Mahoney y col., 1974). Otro factor importante en los cultivos para la producción de lactasa es la aireación, que a diferencia de lo necesario para la obtención de biomasa, debe ser baja, para que el O₂ esté aproximadamente al 10% de saturación (Barberis y Gentina, 1998).

Para la explotación de la actividad lactásica, la enzima se puede emplear en forma soluble o inmovilizada, esto es, confinada en un soporte natural o sintético, más o menos rígido, para permitir su separación del sustrato y del producto de la reacción (Shukla, 1975; Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992; Pivarnik y col., 1995). Con las formas inmovilizadas se consigue generalmente un gran ahorro económico, ya que la lactasa se utiliza sostenidamente durante bastante tiempo, transformando grandes cantidades de sustrato. En ocasiones, las enzimas se inmovilizan en sus propias células, permeabilizando y haciendo no viable al microorganismo fuente que se liga o confina en un soporte, como la enzima purificada; esto ahorra el coste de la purificación y consigue mejorar la preservación de la actividad de la enzima (Pivarnik y col., 1995; Galarraga y Rocandio, 1997). Una variante intermedia entre ambos procedimientos es la retención de las enzimas solubles en espacios limitados por membranas que permiten el paso de sustrato y producto (Shukla, 1975; Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992; Pivarnik y col., 1995). Las técnicas más empleadas para la inmovilización de lactasa han sido descritas en numerosas revisiones (Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985; López-Leiva y Gekas, 1988; Bódalo y col., 1991; Pivarnik y col., 1995).

Entre las fuentes de lactasa que se han empleado para obtener preparaciones inmovilizadas, están algunas cepas de *Lactobacillus* sp., *Streptococcus thermophilus* y *Bacillus circulans*, que producen enzimas termorresistentes. Estas enzimas permiten el empleo de temperaturas de reacción más altas, proporcionando velocidades de transformación elevadas, sin riesgo de proliferación de microorganismos contaminantes (Pivarnik y col., 1995). También se ha estudiado la utilización de enzimas de

microorganismos psicrotrofos como *B. subtilis*, que permitan la hidrólisis de productos lácteos a bajas temperaturas (Pivarnik y col., 1995).

Actualmente, existe un gran número de preparaciones comerciales de lactasa procedentes de mohos y levaduras, como *Maxilact* (*K. lactis*), *Lactozyme* (*K. marxianus*), *Enzeco* (*A. oryzae*), *Yeast lactase L* (*K. lactis*), *Lactase F* (*A. oryzae*) y *Biolactase* (*A. oryzae*) (Gekas y López-Leiva, 1985; Pivarnik y col., 1995), que se comercializan en varios niveles de actividad. Diversas preparaciones comerciales de lactasa inmovilizada, por ejemplo de *Corning Glass*, *Valio Laboratory*, *Sumitomo* o *Snamprogetti* son la base de diversos procesos que llevan años funcionando a escala industrial (Gekas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992; Pivarnik y col., 1995).

Por otro lado, la gran prevalencia de la intolerancia a la lactosa en humanos adultos ha impulsado la comercialización de pequeñas dosis de preparaciones de lactasa soluble, destinadas al uso doméstico por parte del consumidor, que añade la enzima a la leche unas horas antes de su consumo (*Lactaid* se comercializa de esta forma en EEUU desde hace varios años) (Zadow, 1992; Pivarnik y col., 1995).

6. 2. Aplicaciones de la hidrólisis: objetivos pretendidos y otras consecuencias

La principal aplicación de la hidrólisis de lactosa es adaptar la leche (excelente fuente de calcio, proteínas y por ej. riboflavina) para el consumo de personas lactosa-intolerantes. Como otros mamíferos, la mayoría de los humanos (aproximadamente el 70%) pierden la mayor parte de su actividad lactásica intestinal después del destete (Savaiano, 1993). Los adultos lactosa-intolerantes, que pueden ser mayoría de la población en algunas regiones del mundo (Tabla 12), sufren desde molestias abdominales hasta diarreas, al ingerir más de 10 g de lactosa por día (Shukla, 1975; Forsman y col., 1979; Hussein y col., 1989; Zadow, 1992). Para cubrir el mercado de personas lactosa-intolerantes, muchas empresas lácteas comercializan leches UHT con la lactosa hidrolizada en las que de forma estéril se ha inyectado lactasa tras el tratamiento térmico. Son productos de este tipo *Nature's Wonder* (Suecia), *Lactezee* (Canadá y EEUU), *Lactolite* (Reino Unido) y *Kaiku* (España) (Zadow, 1992; Galarraga y Rocandio, 1997).

En países asiáticos donde la intolerancia a la lactosa es mayoritaria entre adultos, la hidrólisis de leche UHT es una práctica bastante generalizada (Zadow, 1992).

Tabla 12. Prevalencia de la digestión y absorción de lactosa.

Poblaciones con alto nivel de absorción de lactosa		Mejicanos americanos	50%
		Judíos	26-46%
		Hindúes	7-100%
Daneses	98%	Poblaciones con bajo nivel de absorción de lactosa	
Suecos	99%		
Finlandeses	87-88%		
Blancos americanos	75-90%		
Blancos canadienses	94%		
Blancos australianos	94-100%		
Beduinos árabes	86%		
Poblaciones con niveles intermedios de absorción de lactosa		Chinos	0-20%
Italianos	0-70%	Japoneses	0-27%
Griegos	33-62%	Indonesios	9%
Mestizos colombianos	75%	Tailandeses	0-4%
		Esquimales Groenlandia	12%
		Mayoría de grupos de Africa	0-20%
		Negros americanos	20-22%
		Árabes sirios	5%
		Árabes jordanos	0-27%
		Ceilandeses	29%
		Iraníes	14%

Tomado de Galarraga y Rocandio (1997).

Por otra parte, la hidrólisis de la lactosa aumenta el dulzor de la leche y el suero sin incrementar su valor calórico y evita los problemas de textura causados por la cristalización de la lactosa en productos deshidratados o congelados, permitiendo su empleo como ingrediente en un mayor número de alimentos (Poutanen y col., 1978; Coelho y col., 1982; Marwaha y Kennedy, 1988; Zadow, 1992; González Siso, 1996). Una de las primeras industrias utilizadoras de leche y suero hidrolizados fue la de elaboración de helados, a los que la lactosa cristalizada confiere una textura arenosa (Pomeranz, 1964). También se ha aplicado la hidrólisis a la fabricación de yogures hipocalóricos dulces (Toba y col., 1990; Pivarnik y col., 1995). Debido al aumento del poder edulcorante, la hidrólisis de lactosa reduce el nivel de sacarosa habitualmente requerido en la formulación de leches condensadas, helados, alimentos infantiles,

caramelos, productos de panadería, bollería, conservas y bebidas (Baeva, 1981; Crippen y Jeon, 1984; Keshavarz y Nakai, 1984; Dorokhovich y col., 1985; Martínez y Speckman, 1988; Marwaha y Kennedy, 1988; Arndt y Wehling, 1989; Pivarnik y col., 1995). Los jarabes hidrolizados se han empleado en la fabricación de sucedáneos de miel y jarabe de arce (Zadow, 1992). Además, en países sin producción azucarera, como Australia o Nueva Zelanda, la hidrólisis de la lactosa constituye una fuente alternativa de azúcares (Coughlin y col., 1974; Marwaha y Kennedy, 1988; Zadow, 1992).

El empleo de leche con la lactosa hidrolizada puede acortar los tiempos de fabricación, proporcionando más sustrato a algunos de los componentes de la microbiota responsable de la maduración de los quesos (Labuschagne y Nieuwoudt, 1978; Farahat y col., 1985; Thakar y col., 1988; Thakar y col., 1992). Muchos microorganismos incapaces de fermentar la lactosa del suero crecen rápidamente en los productos de su hidrólisis, permitiendo así la obtención de distintos derivados del suero (González Siso, 1996). Este es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras empleadas en la industria agroalimentaria para producir etanol, que son incapaces de fermentar la lactosa si no se hidroliza. El suero hidrolizado se puede emplear, como otras fuentes de azúcares, para enriquecer masas de panadería, ya que reduce el tiempo de fermentación y mejora las propiedades de aroma y textura (Drobot y Kudrya, 1981; Matveeva y col., 1983; Polandova y col., 1983). El suero hidrolizado se puede emplear también en la fabricación de cerveza, sustituyendo en parte a la malta (Henning, 1998; Kosminskii y col., 1991), y en la fabricación de vinos (Roland y Alm, 1975; Castillo, 1990). También es considerado como un buen sustrato para la producción de goma xantano por parte de *Xanthomonas* (Kilara y Patel, 1992), y para la de ácidos orgánicos (propiónico o acético), con *Propionibacterium* (Haddadin y col., 1996). Es posible también producir jarabes de glucosa, fructosa y galactosa, hidrolizando el suero con lactasa de *K. lactis* y añadiendo glucosa isomerasa para transformar parte de la glucosa en fructosa, que es más dulce (Abril y Stull, 1989). Muy diversos microorganismos lactasa-negativos pueden ser cultivados en suero hidrolizado para ser empleados como biomasa (Peciulis y col., 1979; Stineman y col., 1978; Peciulis y col., 1982), o como fuente de aminoácidos (Ko y Chipley, 1983).

Con estas aplicaciones, obviamente se consiguen dos beneficios: valorizar el suero o su permeado y minimizar el efecto contaminante que provoca el vertido de lactosa. La acción de la lactasa, sin embargo, no se limita a la hidrólisis. Esta enzima cataliza reacciones de transgalactosidación, transfiriendo, como ya se ha indicado, residuos de galactosa al agua o a distintos azúcares, de manera que se pueden sintetizar galactooligosacáridos (Gal-OS). La formación de Gal-OS es conocida desde los años 50 (Aronson, 1952; Pazur, 1953) y ha sido estudiada por numerosos autores durante la hidrólisis de la lactosa, tanto con lactasas microbianas, como por hidrólisis ácida (Shukla, 1975; Richmond y col., 1981; Olano y col., 1983; Mozaffar y col., 1985; Kwak y Jeon, 1986; Prenosil y col., 1987a; Prenosil y col., 1987b; Hussein y col., 1989; Zárate y López-Leiva, 1990; Zadow, 1992; López-Leiva y Guzmán, 1995). La formación de oligosacáridos durante el proceso de hidrólisis es mayor cuando los tiempos de reacción son cortos, y por tanto, el grado de hidrólisis bajo, y también cuando la concentración de lactosa es elevada, o cuando se emplean temperaturas elevadas, pH alcalino o altas concentraciones de sales. También se ha observado que las enzimas inmovilizadas producen más oligosacáridos que la lactasa soluble. Incluso la procedencia de la enzima influye sobre la tasa de formación de estos compuestos; las lactasas de mohos parecen producir mayor cantidad de Gal-OS que las de levaduras.

Actualmente se están empleando lactasas tanto solubles como inmovilizadas, procedentes de las levaduras *Rhodotorula minuta*, *Sirobasidium magnum* y *Sterigmatomyces elviae* para la producción comercial de Gal-OS (Onishi y col., 1996; Onishi y Yokozeki, 1996; Onishi y Tanaka, 1997; Onishi y Tanaka, 1998; Sheu y col., 1998).

La formación de oligosacáridos ha sido considerada sobre todo como un inconveniente de los tratamientos de hidrólisis. Últimamente, sin embargo, y debido a sus cualidades como *probióticos* (sustancias capaces de estimular la proliferación de la fracción beneficiosa de las bacterias intestinales), los oligosacáridos están adquiriendo gran interés utilizándose, principalmente en Japón, como ingredientes alimentarios en la formulación de alimentos funcionales (Yang y Silva, 1995; López-Leiva y Guzmán, 1995; Onishi y Tanaka, 1998). En general, tanto los galacto-, como otros oligosacáridos no se

digieren ni en el estómago ni en el intestino delgado, de manera que llegan intactos al intestino grueso, donde actúan como promotores del crecimiento de las bifidobacterias (Tanaka y col., 1983; Hartemak y col., 1994; Tomomatsu, 1994; Yang y Silva, 1995). Las ingestas elevadas, no obstante, provocan molestias por formación de gases (el hidrógeno y metano formado por las bacterias que metabolizan estos compuestos) e incluso diarreas (por el agua que retienen).

II. OBJETIVOS

1. Obtener cepas de levadura que crecieran bien en el líquido ultrafiltrado o permeado del suero de quesería y que pudieran servir para reducir la carga contaminante de permeados, sueros y efluentes y en caso de sueros y permeados para ser utilizadas como fuente de proteína y lactasa.
2. Averiguar las posibles ventajas, desde el punto de vista de la depuración, de hidrolizar la lactosa de sueros y permeados, antes de su vertido.
3. Hacer una primera aproximación al estudio de los efluentes de queserías españolas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. LEVADURAS

De la Colección Británica de Levaduras (Norwich, Inglaterra) se utilizaron las siguientes cepas:

Kluyveromyces marxianus NCYC 151
Kluyveromyces marxianus NCYC 587
Kluyveromyces marxianus NCYC 851
Kluyveromyces marxianus NCYC 1429
Kluyveromyces lactis var. *lactis* NCYC 1368
Kluyveromyces lactis var. *lactis* NCYC 1548
Candida kefir NCYC 143
Candida kefir NCYC 744

También se utilizaron las siguientes cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia):

Debaryomyces polymorphus var. *polymorphus* CECT 10060
Debaryomyces polymorphus var. *polymorphus* CECT 10099
Debaryomyces hansenii CECT 10360

Las cepas procedentes de ambas colecciones se mantuvieron en agar inclinado YM (Difco) a 4°C, transfiriéndose mensualmente a medios recién preparados.

Además, se utilizaron levaduras previamente aisladas por nosotros tal y como se describe en el apartado 10 de este Material y Métodos. Estas cepas se conservaron en caldo YM suplementado con un 2% (p/v) de lactosa y un 10% (v/v) de glicerol a -20°C.

2. OTROS MICROORGANISMOS

Los cultivos iniciadores de bacterias lácticas empleados fueron: el 0 R-703 (homofermentativo) y el LD CHN-22 (heterofermentativo) de la marca “Chr. Hansen’s” en su forma comercial “Direct Vat Set (DVS)” liofilizada, cuyas composiciones microbianas se muestran a continuación:

LD CHN-22	0 R-703
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> (5-30 %)	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (1-10 %)	

3. SUERO DULCE Y SU PERMEADO

El permeado se obtuvo a partir de suero dulce donado por la empresa “Lácteas del Jarama” (Fuente del Saz, Madrid). El suero procedía de la fabricación por coagulación enzimática de queso fresco, a partir de una mezcla de leche de vaca (92%), oveja y cabra (8% entre las dos). El suero fue recogido de la cuba de desuerado en recipientes de plástico desinfectados y mantenido en refrigeración hasta su utilización (tiempo no superior a 2 horas). La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos del análisis de varios de dichos sueros a su llegada al laboratorio.

Tabla 13. Algunas características del suero dulce y de su correspondiente permeado.

	Suero	Permeado
pH	6,5 – 6,7	6,4 – 6,6
Lactosa (mM)	100 - 132	110 - 120
Galactosa (mM)	-	1-1,5
Proteína (g/L)	6,9 – 9,57	0,5 – 0,9
DQO (mg/L)	72.500-75.000	45.000-55.000
Microorganismos totales (ufc/mL)	$6,4 \times 10^2 - 7,8 \times 10^4$	0
Bacterias lácticas (en agar MRS; ufc/mL)	$8,1 \times 10^1 - 1,5 \times 10^3$	0

El permeado se obtuvo por ultrafiltración del suero dulce, previamente centrifugado a 4.800 g x 15 min y filtrado a través de lana de vidrio para eliminar restos de grasa y caseína, tal y como se muestra en la Figura 11. Se empleó un equipo de ultrafiltración de flujo tangencial, en el que la dirección del flujo es perpendicular a los canales o poros de las membranas (véase Figura 12).

El equipo está constituido por una célula de filtración de aluminio “Minisette” de la firma “Filtron”, diseñado para procesar volúmenes pequeños (0,2-20 litros) y por una bomba peristáltica “Masterflex” Cole-Parmer modelo 7521-25 de velocidad regulable (10-1000 rpm), dotada de un cabezal “Masterflex” modelo 7017-21. Para la conducción del fluido se utilizó tubo flexible Tygon de “Masterflex” 6409-17 de alta resistencia a la presión. La célula de filtración permite la adaptación de uno o más paquetes compactos de membranas (“cassettes”) y dispone de compartimentos separadores para el líquido retenido y 3 manómetros (para regular la presión del líquido de entrada, del retenido y del filtrado).

Los “cassettes” de membranas utilizados están constituidos por múltiples láminas de membranas filtrantes, entre las que se intercalan mallas separadoras de líquido retenido y filtrado. Cada membrana del “cassette” es un filtro extremadamente fino, de estructura asimétrica, capaz de retener moléculas de un determinado tamaño mínimo (“peso molecular nominal límite”) (Figura 13). Para nuestro trabajo se utilizó un “cassette” de la firma “Filtron” serie Omega con peso molecular nominal límite de 8.000 daltons, formado por membranas de polieter sulfona (PES), modificadas específicamente para minimizar la deposición de proteínas en la superficie y la estructura interna de la membrana. El desarrollo superficial válido de estos “cassettes” es de 3.500 cm². La parte externa del “cassette” es una carcasa protectora de plástico, con colectores para recoger el material retenido y el filtrado.

Para optimizar las condiciones de operación de la ultrafiltración y evitar la colmatación de las membranas, se determinó la presión a emplear, utilizando la expresión:

$$TMP = \frac{P_e + P_s}{2} - P_f$$

TMP = Presión transmembranal
 P_e = Presión de entrada
 P_s = Presión de salida o presión del retenido
 P_f = Presión de filtrado

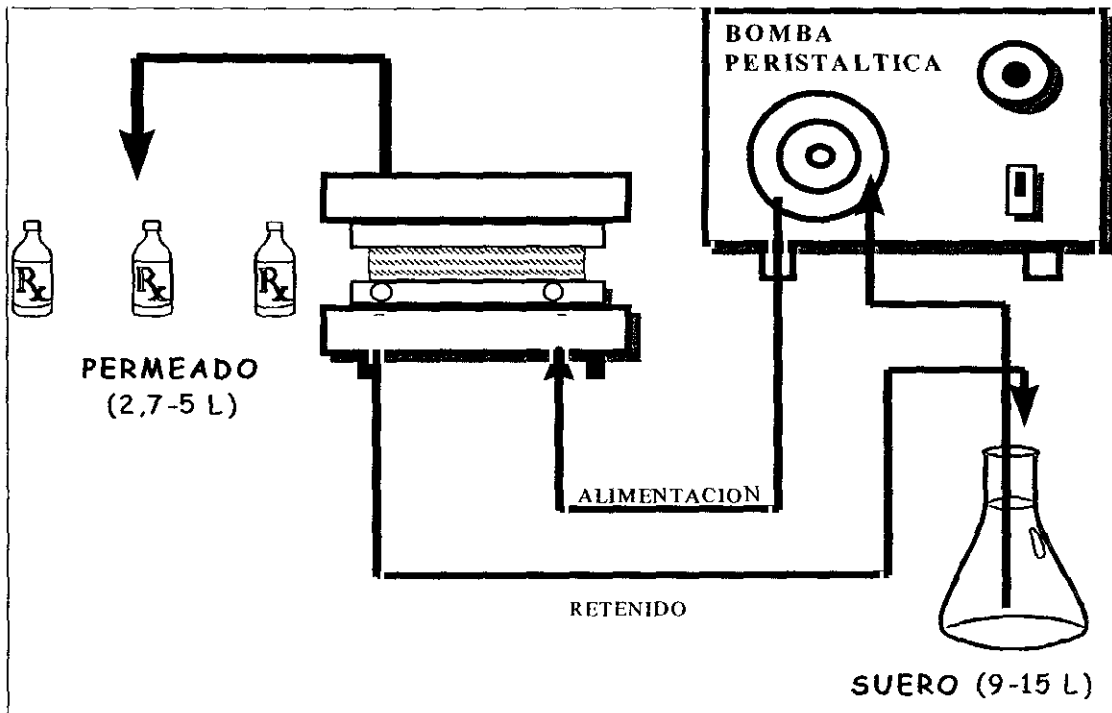


Figura 11. Diagrama de funcionamiento del equipo de ultrafiltración de flujo tangencial.

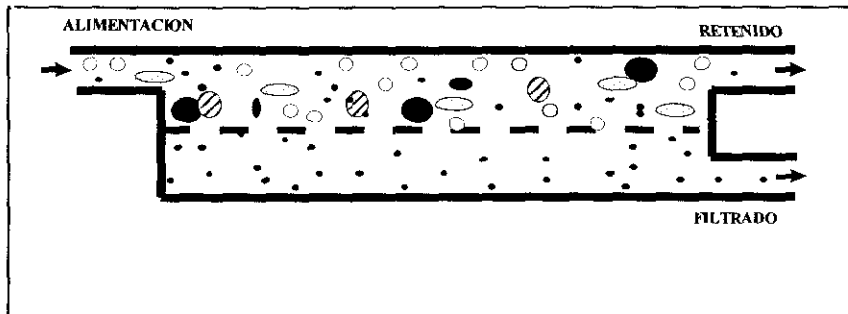


Figura 12. Esquema de una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial.

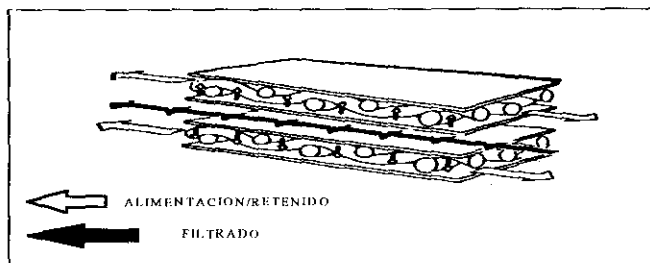


Figura 13. Sección de un "cassette" de ultrafiltración de flujo tangencial

Se aplicaron valores crecientes de TMP y se relacionaron con el flujo de filtrado (expresado en mL/min), hasta que el incremento de la primera no supuso modificación del segundo, lo que corresponde a la saturación de la capacidad de filtración de las membranas. Una vez determinado este valor, se ajustó el sistema para trabajar a una TMP ligeramente inferior a la de colmatación. Los valores establecidos en nuestro caso fueron los siguientes:

- presión de entrada de 19-20 psi.
- presión de salida o presión del retenido de 17-18 psi.
- presión de filtrado de 0 psi.

Esto correspondió a una TMP de 20 psi y permitió una velocidad de filtrado de 17 mL/min.

Habitualmente se filtraron lotes de entre 9 y 15 L de suero.

El permeado obtenido se almacenó en recipientes de plástico de 100, 250 y 500 mL a -20°C hasta su uso (tiempo no superior a 3 meses). Para asegurar la completa disolución de la lactosa, el permeado se descongeló lentamente y se calentó a 30°C durante 1 h antes de ser utilizado como medio de cultivo. La Tabla 13 muestra las principales características del permeado empleado durante este trabajo.

4. EFLUENTES LÁCTEOS

Los efluentes lácteos utilizados para el aislamiento de levaduras, fueron donados por las empresas “Forlasa” (Villarrobledo, Albacete), “Lácteas del Jarama” (Fuente del Saz, Madrid) y “Cooperativa de Ganaderos Manchegos” (Tomelloso, Ciudad Real).

Para conseguir efluentes con características lo más diferentes posible, para obtener una mayor variedad en las levaduras de ellos aisladas, se escogieron tres empresas de muy distinto tamaño, teniendo en cuenta la clasificación de queserías propuesta por Modler (1982), según el volumen diario de leche procesada: Pequeñas (menos de 50.000 L), Medianas (entre 50.000 y 150.000 L) y Grandes (más de 150.000 L).

También se tuvo en cuenta la hora de recogida de las muestras, evitando los momentos en que predominase la descarga de aguas de lavado y fecales. Los efluentes recogidos se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

Estos efluentes se caracterizaron parcialmente mediante análisis químicos y microbiológicos (vease Tabla 36).

A continuación se describen brevemente algunas de las características de las queserías seleccionadas:

4.1. Quesería “Cooperativa de Ganaderos Manchegos”

El volumen de leche procesado diariamente por esta cooperativa oscila entre 3.000 y 4.000 litros. Fabrica queso manchego con Denominación de Origen y queso de mezcla (80% oveja y 20% cabra) a partir de leche pasteurizada y de leche cruda. El suero lácteo se destina en parte a la fabricación de requesón. La mayor parte del efluente lácteo de esta industria estaba constituido por aguas de lavado, líquido procedente de la elaboración de requesón y suero lácteo no aprovechado, aunque también están incluidos los desagües de los lavabos del personal.

4.2. Quesería “Lácteas del Jarama”

“Lácteas del Jarama” procesa diariamente entre 50.000 y 60.000 litros de leche para producir varios tipos de queso, principalmente Mozzarella, queso de Burgos y de Villalón. El suero obtenido se desnata y se destina mayoritariamente a la producción de requesón.

Cuando se tomó la muestra de efluente, sus principales componentes eran aguas de lavado, líquido procedente de la elaboración de requesón, restos de suero y desagües de los lavabos del personal.

4.3. Quesería “Forlasa”

“Forlasa” procesa entre 700.000 y 1 millón de litros de leche al día. Elabora distintos tipos de queso: manchegos con Denominación de Origen, manchegos de mezcla, fundidos,

rallados y azules. La totalidad del suero obtenido es desnatado, desecado por atomización y destinado a la venta.

El efluente está constituido principalmente por aguas de lavado, restos de producción diluidos y desagües de los lavabos.

5. AGUAS RESIDUALES URBANAS

Las aguas residuales urbanas se utilizaron con el fin de obtener un inóculo representativo de la microflora natural presente en estas aguas que habría de proliferar en el permeado, de ser éste vertido directamente a la red de saneamiento. La obtención de estos inóculos se describe en el apartado 9 de este Material y Métodos. Las aguas residuales procedían de las Estaciones Regeneradoras de Aguas Residuales (ERAR) “Valdebebas” y “La China”, pertenecientes al Plan de Saneamiento Integral de Madrid. Estas aguas residuales brutas se recogieron a medio metro de profundidad en el pozo de gruesos (situado en la entrada de la depuradora), en recipientes de plástico y se mantuvieron a temperatura de refrigeración hasta su utilización. El muestreo siempre ha sido puntual y simple. Las muestras, hasta un total de 7, se tomaron en diferentes días. Las principales características de estas aguas residuales se muestran en la Tabla 14 (García Grande, 1986; García Álvarez y Cortacans Torre, 1986).

5. 1. Depuradora ERAR Valdebebas

La planta “ERAR Valdebebas”, próxima a Paracuellos del Jarama (Madrid), trata las aguas residuales procedentes de este municipio y de la zona norte y nordeste de la ciudad de Madrid, con un caudal medio de $0,4 \text{ m}^3/\text{s}$. Recibe una carga contaminante de 144.000 e.h. (habitantes equivalentes) (García Álvarez y Cortacans Torre, 1986).

5. 2. Depuradora ERAR La China

La estación depuradora “E.R.A.R. La China” consta, al igual que la depuradora “E.R.A.R. Valdebebas”, de tratamiento primario y tratamiento biológico por fangos

activados. La base teórica de funcionamiento es la misma, existiendo ligeras diferencias en cuanto al diseño y número de elementos de las diferentes instalaciones. Está capacitada para una población de 1.300.00 habitantes y tiene un caudal medio de 3,3 m³/seg (García Grande, 1986).

Tabla 14. Características de las aguas residuales urbanas recibidas por las depuradoras urbanas “Valdebebas” y “La China”, de Madrid.

Características (mg/L)	<i>Valdebebas</i>	<i>La China</i>
DBO ₅	270	400
DQO	610	780
Sólidos en suspensión	370	420

García Grande (1986) y Álvarez y Cortacans Torre (1986).

6. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

El agua destilada empleada en la preparación de soluciones acuosas y medios de cultivo se obtuvo en un destilador “Millipore” mod. Elix 3. El agua bidestilada se obtuvo de un destilador “Nanopure” mod. Barnstead.

El material de vidrio utilizado en todas las experiencias fue calidad “Pyrex” o similar.

Para la conservación de las muestras en refrigeración se utilizaron frigoríficos “Kelvinator” y “Liebherr” y un armario termostático a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$, construido por un proveedor local. Las muestras que requerían congelación se mantuvieron a -20°C en un armario congelador “AEG” mod. Arctis.

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato “And” mod. EW-600A y las de precisión, en una balanza “And” mod. ER-120A.

Los ajustes y determinaciones de pH se realizaron con un pH-metro “Beckman” mod. ITM 12 pH/ISE Meter.

Las esterilizaciones de los medios y de las soluciones cuya naturaleza lo permitía, se realizaron en autoclaves “Selecta” mod. Autester G y 437-G a 121°C durante 20 min. El material de vidrio se esterilizó por calor seco en horno “Heraeus” mod. KTFU-K a 150°C durante 4 horas. La esterilización de algunas soluciones se llevó a cabo mediante filtros “Acrodisc®” PF 0,8/0,2 µm Supor®.

Las incubaciones se realizaron en estufas “Heraeus” mod. KB-500, F-420 y B-6200, y “Velt” mod. FOC 225D. Las incubaciones con agitación en baño de agua en un incubador-agitador orbital “GFL” mod. 1092. Los medios de cultivo sólidos se fundieron en un horno de microondas “Moulinex” mod. 3535 QT.

Las siembras se realizaron en una cámara de flujo laminar “Telstar” tipo CE-A, equipada con lámpara ultravioleta.

Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio óptico de la marca Nikon mod. L-Ke, equipado con un dispositivo de contraste de fases.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga “Sorvall” mod. RC-5B equipada con rotores SS-34 y GSA. Para centrifugar pequeños volúmenes se utilizó la microcentrífuga “Heraeus Christ” mod. Biofuge A equipada con un rotor tipo 1220.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un aparato “Hitachi” mod. U-2000, y en un colorímetro marca “Milton Roy Company” mod. Spectronic 20.

El fermentador empleado era de la marca “B. Braun-Biotech” mod. Biostat-M con una cuba de fermentación de 2 L. La medida de la presión parcial de oxígeno en los cultivos se realizó con un electrodo tipo Clark marca “Ingold” mod. 3 532 58. El fermentador se acopló a una unidad de termostatación marca “B.Braun-Biotech” mod. Frigomix®. Para el aporte de oxígeno en los cultivos se utilizó una bombona de O₂,

regulándose el flujo de salida con un manómetro mod. M-21-O. En algunos casos, se conectó al fermentador una bomba de aire de acuario “Sirocco” mod. Aireador D-2P.

En la determinación de la Demanda Química de Oxígeno se emplearon matraces de la marca “Afora” de fondo redondo de 500 mL y cuello de vidrio esmerilado 29/32, refrigerantes de serpentín de 300 mm con junta de cristal esmerilado 29/32 y un baño de arena “SBS” Mod. 3A-V.

En la determinación del nitrógeno total, las muestras se calentaron en un digestor “Büchi” mod. 425 y se destilaron en una unidad de destilación “Büchi” mod. 315.

7. REACTIVOS

Todos los productos químicos utilizados en esta tesis eran de calidad reactivo y de las marcas “Merck”, “Sigma” y “Panreac”.

En las experiencias microbiológicas, los productos empleados procedían de las firmas “Difco”, “Oxoid” y “Merck”.

Las enzimas se compraron a “Boehringer”, “Sigma” y “Gist-Brocades”, según se indica en cada caso.

El oxígeno y el nitrógeno se obtuvieron de “Carburos Metálicos, S.A.”.

8. CULTIVOS

8. 1. Medios de cultivo

8. 1. 1. *Caldo para levaduras y mohos (YM) (Difco)*

Para preparar un litro de este medio se disolvieron 21 g de YM deshidratado. Este medio se empleó para la revitalización de las levaduras. Posee la siguiente composición, por litro:

Bacto extracto de levadura	3,0 g
Bacto extracto de malta	3,0 g

Bacto peptona	5,0 g
Bacto dextrosa	10,0 g
pH (aprox.)	$6,2 \pm 0,2$.

Cuando se estudió la capacidad de las levaduras para reducir la DQO del permeado, éstas se revitalizaron en YM suplementado con un 2% (p/v) de lactosa, con el fin de inducir la actividad lactásica. Este suplemento también se añadió para conservar en congelación las levaduras aisladas de efluentes.

8. 1. 2. *Caldo YPD*

Este caldo se empleó como medio de cultivo para la determinación semicualitativa en tubo de la floculación de levaduras, según la descripción de Sherman y col. (1983). Tiene la siguiente composición por litro:

Bacto extracto de levadura	10,0 g
Bacto peptona	20,0 g
D-Glucosa	20,0 g

8. 1. 3. *Agar para levaduras y mohos (YMA)(Difco)*

Su composición química es la misma que la indicada para el medio líquido (8.1.1) pero incluye además 10 g de agar. Este agar se empleó como medio para el recuento en placa de levaduras, tal y como recomienda Wickerham (1951). También se empleó para conservar a 4° C las levaduras procedentes de las colecciones británica y española.

8. 1. 4. *Agar de extracto de malta suplementado con oxitetraciclina (OMEA) (Oxoid)*

Este medio se utilizó para el aislamiento de levaduras procedentes de efluentes lácteos, siguiendo el método recomendado por Fleet y Mian (1987), así como para el recuento en placa de levaduras procedentes de cultivos mixtos. La composición química por litro de agar de extracto de malta (MEA) es la siguiente:

Extracto de malta	30,0 g
Peptona micológica	5,0 g
Agar	15,0 g
pH $5,4 \pm 0,2$	

Al medio MEA se le adicionó clorhidrato de oxitetraciclina (Terramicina® 100, “Pfizer”) a una concentración final de 100 µg/mL.

8. 1. 5. Agar Rosa-Bengala Cloranfenicol (RBC) (Oxoid)

Este agar se utilizó para el recuento selectivo en placa de levaduras procedentes de cultivos mixtos, tal y como describe Jarvis (1973). Para su preparación se disolvieron 32 g de Agar Rosa-Bengala por litro de medio. Su composición por litro del medio es la que sigue:

Peptona micológica	5,0 g
Dextrosa	10,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Sulfato magnésico	0,5 g
Rosa de Bengala	0,05 g
Agar	15,5 g
pH $7,2 \pm 0,2$.	

A este medio se le adicionó cloranfenicol (“SIGMA”) disuelto en etanol a una concentración final del 0,01% (p/v).

8. 1. 6. Agar para recuento en placa (PCA) (Oxoid)

Este agar se utilizó como medio para el recuento en placa de microorganismos totales, empleando 17,5 g por litro de agua. Su composición por litro es:

Tryptona	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar	9,0 g

8. 1. 7. *Agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Oxoid)*

Este agar se utilizó como medio para el recuento en placa de las bacterias lácticas, tal y como describe Reuter (1985). Su composición por litro de medio es:

Peptona	10,0 g
“Lab.Lemco” en polvo	8,0 g
Extracto de levadura	4,0 g
Dextrosa	20,0 g
Tween 80	1,0 mL
Fosfato dipotásico	2,0 g
Acetato de sodio.3 H ₂ O	2,0 g
Citrato de triamonio	5,0 g
Sulfato de magnesio.7H ₂ O	0,2 g
Sulfato de manganeso.4H ₂ O	0,2 g
Agar	10,0 g
pH 6,2 (aprox)	

8. 1. 8. *Agar Man, Rogosa, Sharpe-ácido sórbico (MRS-S) (Oxoid)*

Este agar se utilizó en ocasiones como medio selectivo para el recuento de bacterias lácticas, tal y como recomienda Reuter (1985). Al medio MRS, cuya composición se indica en el apartado anterior, se le adicionó ácido sórbico disuelto en NaOH 1M, para obtener una concentración final del 0,06% (p/v) o del 0,1% (p/v), según se indique. Posteriormente se ajustó el pH del medio a 5,7 con HCl 2,5 N.

8. 1. 9. *Agar-ácido sórbico (LaS) (Merck)*

Este medio se utilizó para la generalidad de los recuentos selectivos en placa de bacterias lácticas, tal y como recomienda Reuter (1985). Para su preparación se disolvieron 70 g en 1 litro de agua destilada, añadiéndose ácido sórbico disuelto en NaOH 1M a una concentración final del 0,04% (p/v). Posteriormente se ajustó el pH del medio a $5,0 \pm 0,1$ con HCl 2,5 N. Su composición por litro de medio es la siguiente:

Peptona de caseína	10,0 g
Extracto de malta	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
D (+) glucosa	20,0 g
Acetato de sodio	5,0 g
Citrato de sodio	3,0 g
Tween 80	1,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agar-agar	16,0 g

8. 1. 10. *Agar MacConkey (púrpura) (Oxoid)*

Este agar se empleó para el recuento en placa de bacterias coliformes (British Department of Environment, 1982). Su composición por litro de medio es:

Peptona	20,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	5,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Agar	15,0 g
pH 7,4 (aprox.).	

8. 1. 11. *Permeado de suero dulce*

El permeado utilizado como medio de cultivo se obtuvo tal y como ya se ha descrito en el apartado 3 de este Material y Métodos.

8. 1. 12. *Permeado con la lactosa hidrolizada*

En los cultivos inoculados con la flora procedente de aguas residuales urbanas, se utilizó permeado (ver 8.1.11) previamente incubado con β -galactosidasa, para comprobar el

efecto de la hidrólisis de la lactosa en la evolución de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), del líquido libre de células.

Para la obtención de permeado con la lactosa hidrolizada se utilizaron varias concentraciones de una preparación comercial de β -galactosidasa de *Kluyveromyces* (antes *Saccharomyces*) *lactis* de 2.000 unidades de lactasa neutra (u.l.n.)/g (Maxilact L 2.000), de la marca Gist-Brocades. El pH del permeado se ajustó a 6,5 (pH óptimo para esta enzima) con KOH 8M. Posteriormente, dado que el pH de los permeados siempre fue próximo a 6,5 (véase Tabla 13), y que se mantuvieron los porcentajes de hidrólisis, se trabajó sin ajuste de pH. Las mezclas se incubaron a 30°C y 100 rpm tomándose alícuotas de 1 mL cada 2 horas. Cuando se estuvo determinando el grado de hidrólisis y para detener la reacción, las muestras de permeado con enzima se calentaron a 80°C durante 3 min, tal y como describen Chiu y Kosikowski (1985). Las condiciones finalmente seleccionadas fueron 3000 uIn por litro de permeado incubando a 30°C y a 100 rpm durante 10 h, sin posterior inactivación de la enzima.

En los permeados, se realizaron controles microbiológicos para asegurarse de la ausencia de bacterias totales antes y después del periodo de incubación.

8. 1. 13. Suero dulce

Las principales características del suero dulce procedente de la quesería “Lácteas del Jarama”, se muestran en la Tabla 13 de este trabajo. Antes de ser utilizado como medio de cultivo, el suero se centrifugó a 4.800 g x 15 min para eliminar los restos de caseína y grasa.

8. 2. Condiciones de cultivo

Todas las levaduras se revitalizaron antes de ser sembradas en los medios de cultivo, para lo que se inocularon en 5 mL de caldo YM y se incubaron en condiciones estáticas a 30°C durante 18 horas. Cuando se quiso partir de células con la lactasa inducida, la

revitalización se realizó en caldo YM suplementado con 2% lactosa. Antes de ser inoculadas en los medios, las células se lavaron dos veces en agua destilada estéril, y se recuperaron mediante centrifugación a 4.520 g durante 10 min, resuspendiéndose en agua destilada. La absorbancia a 600 nm de las células resuspendidas se ajustó a 0,4 (aprox.), diluyendo con agua destilada (esta absorbancia equivale aproximadamente a 10^7 ufc/mL). Estas suspensiones celulares se utilizaron para inocular al 0,001, 0,01, 0,04 y 0,4% (v/v) según los casos, matraces Erlenmeyer de 250 mL (que contenían 150 mL del medio), de 100 mL (que contenían 50 mL de medio) o de 50 mL (que contenían 25 mL de medio), para obtener niveles iniciales aproximados de 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 ufc de levaduras/mL, respectivamente. Todos estos cultivos sembrados con levaduras se incubaron a 30°C en un baño-incubador orbital, con una agitación de 150 rpm.

En los cultivos de levaduras realizados en fermentador, se añadió un 0,01% (v/v) de la suspensión celular correspondiente a 1,2 L de permeado, lo que equivalía aproximadamente a 10^5 ufc/mL. Las fermentaciones se realizaron a 30°C y con una agitación de 200 rpm. La presión parcial de oxígeno en los cultivos se mantuvo al 60% mediante el aporte de oxígeno puro con un flujo máximo de entrada de 1,6 vvm (volumen de gas por volumen de medio por minuto). La formación de espumas en estos cultivos se controló mediante la adición de antiespumante ("B.Braun-Biotech") al 0,05%.

Cuando el permeado, utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de levaduras, se suplementó con distintos compuestos (sulfato amónico, fosfato dipotásico y cloruro férrico), las correspondientes soluciones se filtraron por filtros "Acrodisc" 0,22 μ m antes de ser añadidas al permeado, extremando las condiciones de higiene.

Las suspensiones celulares procedentes de aguas residuales urbanas, obtenidas como se describe en el apartado 9, se utilizaron para inocular al 10% (v/v) 50 mL de permeado, contenidos en matraces erlenmeyer de 100 mL de capacidad. Los correspondientes cultivos se incubaron a 30°C en un baño-incubador orbital, con una agitación de 150 rpm.

Para el estudio de floculación, los precultivos con la lactasa inducida se transfirieron al 0,5% (v/v) a tubos de 7 mm de diámetro y 10 mL de capacidad que contenían 5 mL de permeado o de caldo YPD, y se cultivaron a 30°C y 100 rpm durante 72 h.

La sedimentación se estudió después de inocular los precultivos con la lactasa inducida al 1% (v/v) en matraces de 500 mL que contenían 350 mL de permeado, y de incubar a 30°C y 100 rpm durante 72 h.

8. 3. Toma de muestras

A lo largo de todas las incubaciones se tomaron, en condiciones estériles, alícuotas comprendidas entre 1,5 y 100 mL de los distintos líquidos de cultivo. Para la estimación del crecimiento de las levaduras y de las bacterias, las muestras se utilizaron inmediatamente.

Las muestras empleadas en el estudio de la actividad lactásica se conservaron tal y como se describe posteriormente en el apartado 12. 1 de este Material y Métodos.

Para el análisis de compuestos de bajo peso molecular y determinación de la DQO, COT, CIT y nitrógeno total, se utilizaron los sobrenadantes libres de células, obtenidos por centrifugación de las muestras a 14.913 g durante 5 min, y conservados a -20° C hasta su uso.

8. 4. Estimación del crecimiento de los microorganismos

Para la estimación del crecimiento de los microorganismos, se realizaron diluciones decimales de las distintas muestras en agua de peptona, utilizándose 0,1 mL de la dilución correspondiente para las siembras en superficie y 1 mL para las siembras en profundidad.

La estimación del crecimiento de las levaduras en cultivos puros se realizó mediante siembra en profundidad en agar YM. Las placas se incubaron a 30° C durante 3 días, según indica Wickerham (1951).

El crecimiento de las levaduras en los cultivos en suero dulce y en los efluentes lácteos se estimó mediante siembra en superficie en agar OMEA. Las placas se incubaron a 25°C durante 3 días (Fleet y Mian, 1987). Los mohos y levaduras en efluentes se estimaron con el medio OMEA.

En los cultivos en suero dulce se estimó el crecimiento de las levaduras mediante siembra en profundidad en agar RBC. Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días (Seiler, 1985).

El recuento de bacterias lácticas presentes en las aguas residuales urbanas y en los efluentes lácteos se realizó mediante siembra en superficie en agar LaS. Este mismo método también se empleó para estimar el crecimiento de estas bacterias en permeados inoculados con aguas residuales urbanas. Las placas se incubaron a 30° C durante 2 días, tal y como indica Reuter (1985).

El recuento de bacterias lácticas presentes en el suero lácteo y en su correspondiente permeado, se estimó mediante siembra en agar MRS. El agar MRS-S se empleó en los cultivos en suero dulce inoculado con levaduras, para estimar el crecimiento de la flora láctica. Las siembras en agar MRS y MRS-S se realizaron en profundidad, añadiendo una segunda capa de agar que cubriera a la de siembra para conseguir las condiciones de microaerofilia. La incubación se realizó a 30° C durante 3 días, tal como indica Reuter (1985).

Para estimar la concentración de bacterias coliformes en los cultivos inoculados con las aguas residuales urbanas y en los efluentes lácteos, se realizaron siembras en superficie en agar MacConkey. Las placas se incubaron a 37° C durante 2 días (British Department of Environment, 1982).

El recuento total de microorganismos presentes en el suero, permeado y efluentes lácteos y en los cultivos inoculados con aguas residuales urbanas, se realizó mediante siembra en profundidad en PCA, incubando las placas a 30° C durante 2 días.

En todos los casos, los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia por mL de cultivo (ufc/mL).

Para calcular el tiempo de duplicación celular (td) se utilizó la representación del logaritmo neperiano de las ufc/mL en función del tiempo de crecimiento (expresado en horas). A partir de la recta de regresión resultante de la fase exponencial del crecimiento, se

obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ), que es la pendiente de la citada recta. El tiempo de duplicación es el $\ln 2/\mu$.

9. OBTENCIÓN DE FLORA MICROBIANA DE AGUAS RESIDUALES URBANAS

La flora natural procedente de aguas residuales urbanas se utilizó como inóculo para comparar la reducción de la DQO, al proliferar en permeado dulce normal y con la lactosa hidrolizada. Para obtenerla, las muestras de aguas residuales urbanas se mantuvieron a 4°C durante 4 horas, para favorecer la decantación de las partículas más groseras. Posteriormente, se recogió la parte superior del sobrenadante (aprox. 1/3) y se mantuvo a 4°C durante 15 h. Transcurrido este tiempo, 200 mL de este sobrenadante se centrifugaron a 3.330 g durante 10 min y el sedimento se resuspendió en 20 mL de agua destilada estéril. Esta suspensión celular se utilizó para inocular los distintos tipos de permeado como se describe en el apartado 8. 2 sobre Condiciones de Cultivo.

10. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

10. 1. Aislamiento de levaduras a partir directamente de efluentes lácteos

Para el aislamiento de levaduras se sembraron en superficie, en agar OMEA (selectivo para mohos y levaduras), las correspondientes diluciones de los efluentes en agua de peptona. Las placas se incubaron a 25°C hasta que el tamaño de las colonias fue lo suficientemente grande como para poder ser aisladas (2-3 días) (Fleet y Mian, 1987). Para la selección de colonias se siguió el método aleatorio descrito por Ordoñez (1979). Las colonias seleccionadas se recogieron con un asa de platino y se sembraron en tubos con caldo YM suplementado con 2% de lactosa, incubándose a 25°C durante 24 h. A estos cultivos se les adicionó glicerol al 10% (v/v) para su conservación a -20°C.

10. 2. Aislamiento de levaduras adaptadas a permeado

Para seleccionar de la flora de efluentes de quesería, las levaduras más aptas para crecer en permeado, se prepararon mezclas que contenían 50 mL de permeado y 50 mL del efluente lácteo correspondiente. Estas mezclas se incubaron a 30°C durante 6 días, sustituyéndose diariamente la mitad del volumen de cada cultivo por permeado fresco. El aislamiento de levaduras a partir de estas mezclas se realizó siguiendo el método descrito en el apartado anterior.

10. 3. Selección de levaduras

Del conjunto de cepas de mohos y levaduras aislados en medio OMEA directamente o tras adaptación, se eliminaron los mohos. Para ello, cada cepa se inoculó en dos tubos conteniendo caldo YM con 2% de lactosa. A uno de ellos se le adicionó una capa de aceite de parafina estéril de aproximadamente 1 cm de espesor para conseguir condiciones de microaerofilia (no toleradas por mohos), mientras que el otro se mantuvo intacto; el tipo de crecimiento en ambos tubos fue registrado tras la incubación a 25°C durante 24 h descartándose las cepas incapaces de crecer en microaerofilia. Posteriormente, los cultivos procedentes de los tubos sin parafina se sembraron en superficie en agar OMEA. Las placas se incubaron a 25°C durante 72 h, anotándose las principales características morfológicas de las colonias obtenidas. Todas las cepas aisladas se observaron al microscopio óptico tras tinción Gram con objetivo de inmersión, para comprobar que se trataba de levaduras. Todas las cepas cuya morfología no se correspondió con la típica de levaduras fueron descartadas.

Las cepas aisladas AT 7, AT 10, AF 9, DF 5 y DF 27 seleccionadas por mayor aptitud para los fines de este estudio, fueron enviadas para su identificación a la División de Levaduras (Servicio de Identificación) del “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS), (Delft, Holanda). El procedimiento de identificación hizo uso de las siguientes pruebas:

* Pruebas de pureza

* Observaciones morfológicas con microscopía de campo brillante

* Propiedades fisiológicas:

- Fermentación de 6 azúcares
- Pruebas de utilización en medio líquido de 43 compuestos carbonados
- Pruebas de utilización en agar de 4 compuestos nitrogenados
- Resistencia a la cicloheximida al 0,01%
- Crecimiento a 37°C

Los datos obtenidos se procesaron mediante el programa de identificación de J.A. Barnett, R.W. Payne y D. Yarrow, versión 4.0.

11. ANÁLISIS POST-CULTIVO DE SUEROS Y PERMEADOS

11. 1. Determinación de proteínas

La determinación del contenido proteico del suero, permeados y efluentes lácteos se realizó según el método descrito por Lowry y col. (1951). Como proteína estándar se utilizó seroalbúmina bovina.

11. 2. Determinación de nitrógeno total

El contenido en nitrógeno total de las muestras se determinó mediante el método de Kjeldahl (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1985). Los tubos de digestión conteniendo 75 mL de muestra se desecaron durante una noche a 100°C; después, se les adicionaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, unas perlas de vidrio y un catalizador compuesto por 5 g de K₂SO₄ y 0,005 g de selenio ("Kjeltabs S", Thompson and Capper Ltd.). A continuación, las mezclas se calentaron en un digestor hasta completar su digestión (1,5-2 horas). Las mezclas digeridas se diluyeron con agua y se destilaron, recogiendo el amoníaco en 25 mL de una solución de ácido bórico al 4%. A continuación se tituló la mezcla de borato amónico obtenida, con una solución de HCl 0,5 N. Como indicador del punto final de esta valoración se utilizó una solución de rojo de metilo al 0,2% y de azul de

metileno al 0,1%, disueltos en alcohol etílico (96% v/v). Este indicador vira de violeta a verde a pH 5,4.

El porcentaje de nitrógeno se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Nitrógeno} = V \times N \times 14,007 \times 1000 / \text{mL muestra}$$

V = volumen (mL) de HCl empleado en la valoración

N = normalidad del HCl

Los resultados finales se expresaron en mg de N/L de muestra.

11. 3. Determinación de los sólidos totales, sólidos disueltos y biomasa

La determinación de los sólidos totales de las muestras se realizó desecando a 100°C un volumen de 100 mL hasta peso constante, tal y como recomienda la AOAC (1995). Para determinar los sólidos disueltos y la biomasa, 150 mL de muestra se centrifugaron a 6.540 g durante 15 min, desecándose a 100°C hasta peso constante, tanto el sobrenadante como el sedimento.

11. 4. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La determinación de la DQO se hizo en los líquidos libres de células, siguiendo el método normalizado 973.46E recomendado por la AOAC (1995) para el análisis de efluentes industriales. Este método se basa en la oxidación de las sustancias orgánicas por el dicromato potásico disuelto en ácido sulfúrico, a temperatura de ebullición, en presencia de sulfato de plata (catalizador) y de sulfato de mercurio (para eliminar las interferencias con el cloro). El exceso de dicromato potásico se valora con Fe^{+2} , utilizando ferroína como indicador.

En cada matraz vacío se añadieron, por este orden, perlas de vidrio y 1 g de HgSO_4 . Después se incorporaron lentamente y en frío 5 mL de H_2SO_4 , 25 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,25 N,

70 mL de una solución AgSO_4 32,5 mM en H_2SO_4 al 96% y 50 mL de la muestra. Los matraces se mantuvieron en ebullición a reflujo durante 2 horas. Una vez fríos, los tubos refrigerantes se aclararon con agua destilada, incorporándose este agua de lavado a las mezclas de reacción. Finalmente, dichas mezclas se enrasaron a 300 mL con agua destilada.

El exceso de dicromato potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) se valoró con sal de Mohr [$\text{Fe}(\text{HH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], utilizando 9 gotas de sulfato ferroso de fenantrolina (ferroína) 0,025 M como indicador. Se consideró como punto final de la valoración, el primer viraje de color de azul verdoso a marrón rojizo. Como blanco se utilizaron 50 mL del mismo agua destilada empleada en la preparación de los reactivos y en las diluciones de las muestras.

La normalidad de la sal de Mohr empleada se determinó valorando con una mezcla de 25 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,25 N, 75 mL de H_2SO_4 y 200 mL de H_2O destilada, usando 10 gotas de ferroína como indicador y empleando la fórmula:

$$N = (\text{mL de } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times N \text{ de } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) / \text{mL de sal de Mohr}$$

La Demanda Química de Oxígeno (expresada en mg O_2/L) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{DQO (mg/L)} = [(B - M) \times N \times 8000] / V$$

B= volumen en mL de la sal de Mohr empleados en la valoración del blanco.

M= volumen en mL de la sal de Mohr empleados en la valoración de la muestra.

N= normalidad de la sal de Mohr.

V= volumen en mL de la muestra (50 mL).

11. 5. Determinación del Carbono Orgánico Total (COT) y del Carbono Inorgánico Total (CIT)

La determinación del Carbono Orgánico Total (COT) y del Carbono Inorgánico Total (CIT) se realizó mediante oxidación húmeda a baja temperatura, en un analizador

automático de la marca “O.I. Analytical” mod. TOC Analyzer 1010. Este analizador opera según el método estándar 5310D recomendado por la APHA-AWWA-WEP (1992). Su esquema de funcionamiento se muestra en la Figura 14.

Este equipo determina en primer lugar el CIT de las muestras y posteriormente el COT. 5 mL de muestra se introducen en el vaso de reacción mediante aspiración automática (“sample loop”). A continuación, se dispensan 300 μL de ácido fosfórico al 5% (v/v) para oxidar todos los compuestos inorgánicos (carbonatos, bicarbonatos, etc.) a CO_2 , siendo el tiempo de reacción establecido de 1,30 min. El CO_2 producido se extrae de la muestra mediante borboteo de nitrógeno gaseoso y se transporta hasta un detector No Dispersivo de Infrarrojos (NDIR). Finalmente, se añaden 600 μL de una solución de persulfato sódico de 150 g/L, aumentándose la temperatura de la mezcla de reacción hasta 100°C durante 2,30 min, para transformar el carbono orgánico de las muestras en CO_2 . De nuevo, el CO_2 producido se registra en el detector NDIR, una vez desplazado de las muestras por borboteo de nitrógeno. El tiempo de detección seleccionado para ambos tipos de análisis fue de 1,30 min.

Las muestras se diluyeron en agua bidestilada de forma que la cantidad de carbono estuviera comprendida dentro del intervalo de sensibilidad del ensayo. Como blanco se utilizó el mismo agua bidestilada empleada para diluir las muestras, y los valores de CIT y COT obtenidos se restaron a los de las muestras. La concentración de COT y CIT se determinó utilizando una curva patrón de biftalato de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) (“IO Analytical”) (1 μg de carbono/ μL). Los resultados de COT y CIT se expresaron en mg/L.

11. 6. Determinación de compuestos orgánicos solubles

El estudio de los compuestos orgánicos solubles producidos durante el cultivo de aguas residuales urbanas, se realizó por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) y por análisis enzimático.

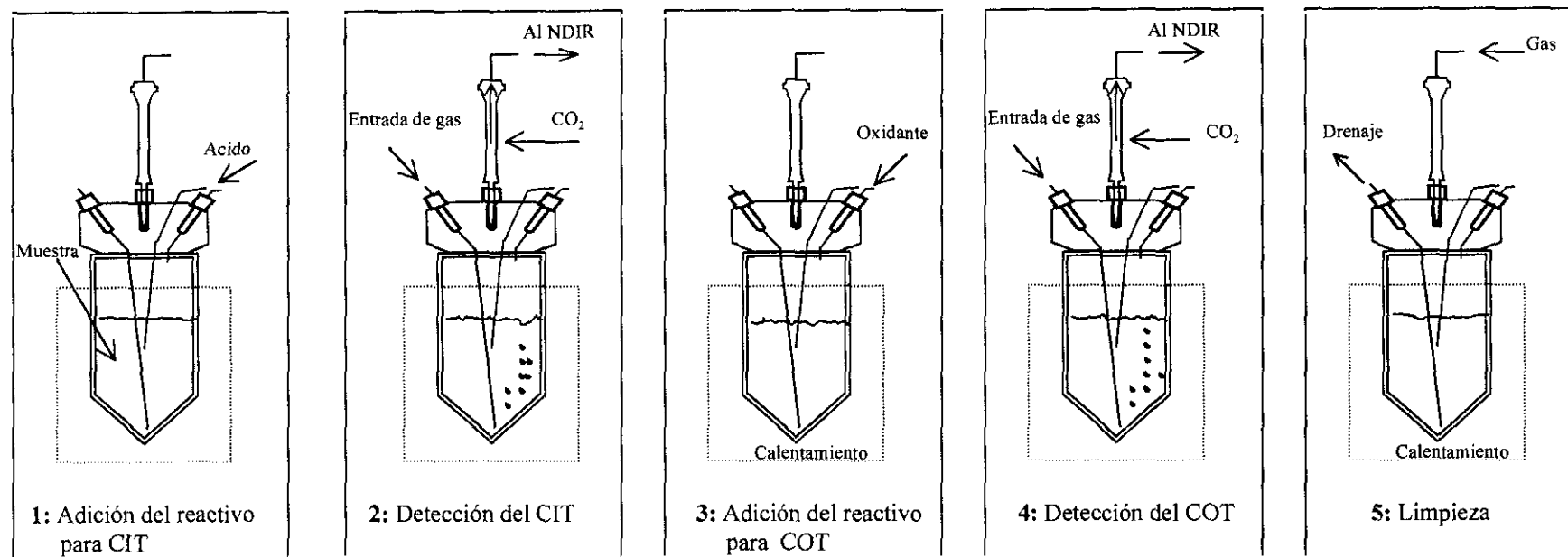


Figura 14. Esquema de funcionamiento del analizador CIT/COT "TOC Analyzer 1010".

11. 6. 1. Toma de muestras

Las muestras (10 mL) de los tiempos finales de cultivo se tomaron con jeringa y se inyectaron en vial de cristal herméticamente cerrado, extremando las precauciones para minimizar las pérdidas de volátiles en la manipulación. Para detener el crecimiento de los microorganismos presentes en el cultivo se adicionó azida sódica al 0,02%. Posteriormente, las muestras se congelaron a -20°C hasta su análisis.

11. 6. 2. Análisis de compuestos orgánicos por GC-MS

El análisis de componentes solubles se llevó a cabo mediante la inyección de 1 μL de las muestras en un equipo integrado por un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP 5890A, acoplado a un detector de masas HP 5971 A, con fuente de ionización por impacto electrónico (EI) a 70eV. La temperatura del inyector y de la interfase fue de 250°C . El rango de masas fue de 40-350 unidades de masa atómica. La longitud de la columna utilizada fue de 10 m, con un diámetro de 0,25 mm y un espesor de fase de 0,37 μm de polietilenglicol (FFAP). El programa de temperatura se inició en 80°C , para ir aumentando con una rampa de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar la temperatura final de 210°C , que se mantuvo durante 20 minutos, trabajando a una presión de gas portador (He) de 20 KPa.

11. 6. 3. Identificación de los compuestos

El sistema de tratamiento de datos se realizó mediante el programa HP ChemStation. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los espectros obtenidos con los de la biblioteca Wiley.

11. 7. Determinación enzimática de compuestos de bajo peso molecular

11. 7. 1. Preparación de las muestras

El permeado se utilizó, sin tratamiento previo, para la determinación de compuestos de bajo peso molecular. Sin embargo, los efluentes lácteos y el suero, fueron

desproteinizados, siguiendo el procedimiento descrito por Beutler (1984), antes de utilizarse para la determinación de lactosa. Para ello, 5 mL de muestra se mezclaron con 10 mL de ácido perclórico 1 N, la mezcla se centrifugó a 4.520 g durante 15 min y el sobrenadante separado se ajustó a pH 7 con KOH 2M. A continuación, las muestras se mantuvieron a 4°C durante 30 min, para favorecer la formación de cristales de perclorato potásico, que se separaron por filtración a través de papel "Watman" nº 1. El filtrado se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Para evaluar la posible pérdida de lactosa durante el proceso de preparación de las muestras de efluentes lácteos y suero, se determinó el porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de lactosa, añadida a muestras de efluentes lácteos y de suero. Los resultados referentes a lactosa se expresaron una vez aplicada la tasa de recuperación.

11. 7. 2. Ensayos enzimáticos

La determinación de galactosa, glucosa, ácido acético, ácido láctico, etanol, glicerol y en algunos casos lactosa, se realizó con los kits enzimáticos de "Boehringer" que se indican en la Tabla 15.

Tabla 15. Kits comerciales de Boehringer

Compuesto	Método	Nombre comercial	Nº Cat.
Lactosa	Ultravioleta	Lactose/D-Galactose	176 303
Galactosa	Ultravioleta	Lactose/D-Galactose	176 303
Glucosa	Colorimétrico	Glucose God-Perid®	111 111
Acido acético	Ultravioleta	Acetic acid	148 261
Acido láctico	Ultravioleta	Lactic acid	139 084
Etanol	Ultravioleta	Ethanol	176 290
Glicerol	Ultravioleta	Glycerol	148 270

En la mayor parte de las muestras, sin embargo, la concentración de lactosa se determinó no por kit, sino por el procedimiento descrito por Beutler (1984), con β -galactosidasa y lactosa deshidrogenasa de “Boehringer” (n° cat. 745.731 y 662.046, respectivamente).

12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACTÁSICA INTRA- Y EXTRACELULAR

12. 1. Preparación y conservación de las muestras

5 mL procedentes de un cultivo de levadura de 16 h se centrifugaron a 4.520 g durante 5 min, congelándose inmediatamente el sobrenadante obtenido a -20°C , para el análisis de la actividad lactásica extracelular. Por otra parte, las células se lavaron resuspendiéndose en tampón estéril fosfato (K_2HPO_4 73 mM; KH_2PO_4 38 mM y MgSO_4 1mM; pH 6,5), se volvieron a centrifugar y se recuperaron en 5 mL de tampón (Figura 15). La suspensión celular se conservó a -20°C , durante un tiempo no superior a 72 h, hasta proceder a la permeabilización de las células.

12. 2. Permeabilización de las células

Las células se permeabilizaron añadiendo tolueno a 5 mL de una suspensión celular con una concentración de 10^7 ufc/mL, hasta una concentración final del 2% (v/v). Las mezclas se incubaron a 37°C y 150 rpm durante 40 min.

En pruebas metodológicas previas se probó para permeabilizar cloroformo que se incorporaba al 2% a una suspensión celular obtenida como se ha indicado anteriormente, incubándose las mezclas a 37°C y 150 rpm. La permeabilización con cloroformo también se probó añadiendo al solvente tampón fosfato con EDTA disódico 50 μM .

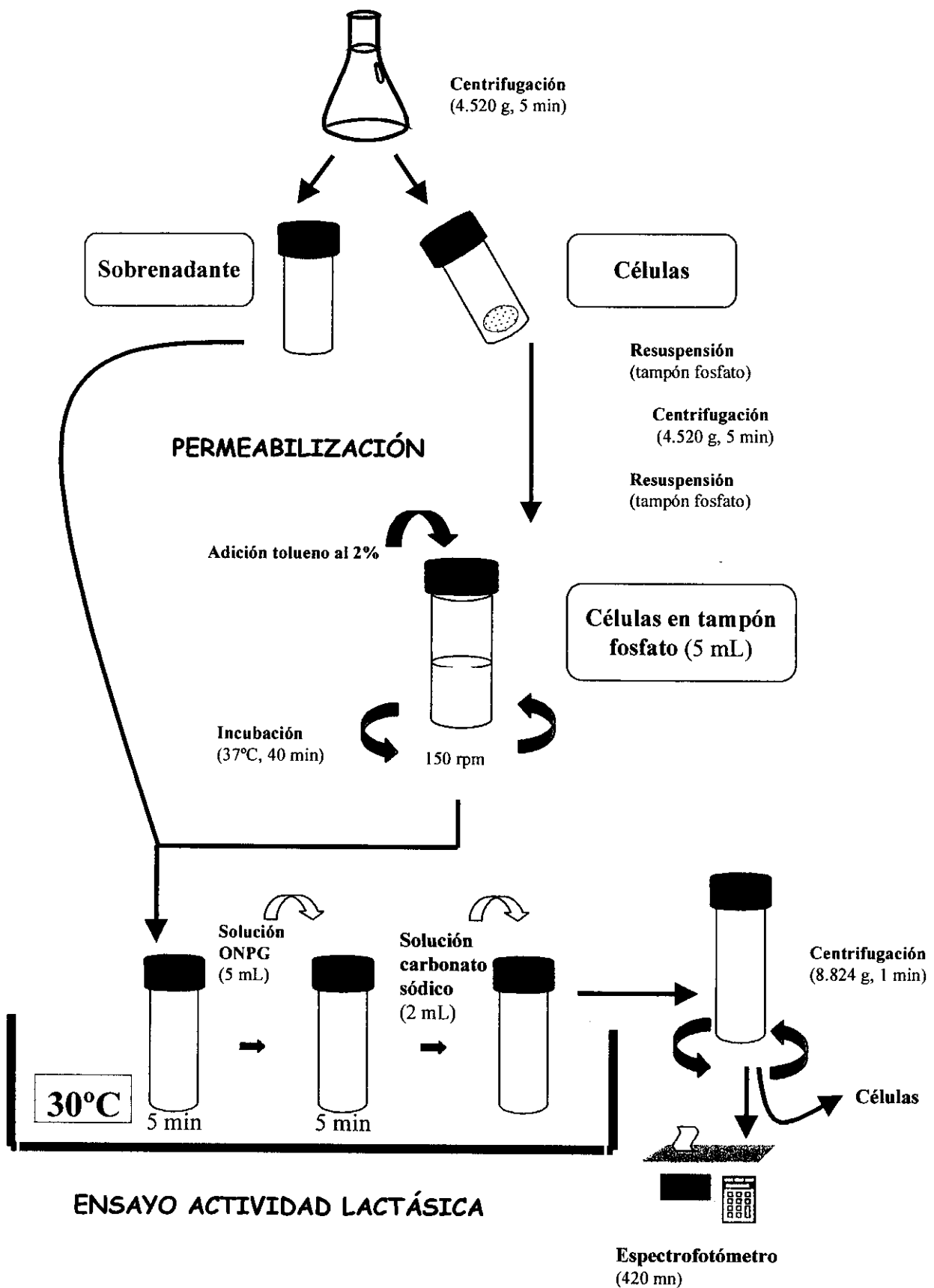


Figura 15. Preparación, permeabilización y ensayo de la actividad lactásica de las levaduras.

12. 3. Actividad lactásica

La actividad lactásica fue valorada por el método colorimétrico representado en la Figura 15 y propuesto por la FIL (Engelen y Randsdorp, 1999) tras los resultados obtenidos de un estudio colaborativo, en el cual participó nuestro laboratorio. Este método utiliza el o-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG) como sustrato. Como muestras, se tomaron 2 alícuotas de 1 mL, de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos y de cada suspensión celular permeabilizada, para determinar la actividad extra e intracelular, respectivamente. Una de las alícuotas se incubó durante 5 min a 30°C en un tubo de 15 x 150 mm, añadiéndosele a continuación 5 mL de una solución de ONPG 8,3 mM en tampón fosfato (K_2HPO_4 73 mM; KH_2PO_4 38 mM, $MgSO_4$ 1mM y EDTA- Na_2 50 μ M; pH 6,5). Tras incubarse la mezcla otros 5 min a 30°C, la reacción se detuvo añadiendo 2 mL de una solución de carbonato sódico (Na_2CO_3 0,6 M y EDTA- Na_2 0,1 M). La otra alícuota se empleó como control, adicionándose primero la solución de carbonato sódico y después el ONPG. Antes de medir la absorbancia a 420 nm, se eliminaron las células centrifugando las muestras a 8.824 g durante 1 min. Al valor de la primera alícuota se le restó el de su correspondiente control. Como patrón se utilizó o-nitrofenol. La actividad lactásica intracelular y extracelular se expresaron como la cantidad de enzima que libera 1 nmol de o-nitrofenol por 10^7 u.f.c. por minuto y la cantidad de enzima que libera 1 nmol de o-nitrofenol por mL y por minuto, respectivamente.

13. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FLOCULANTE DE LAS LEVADURAS

Los estudios de floculación se realizaron siguiendo una modificación del método semicualitativo descrito por Watari y col. (1991). Tras el crecimiento, los tubos se agitaron en Vórtex durante 1 min a alta velocidad. Posteriormente, se dejaron reposar verticalmente durante 3 min, observándose visualmente la precipitación o flotación de los flóculos formados. La observación se realizó sobre fondo negro y con luz incidente directa para favorecer la visibilidad. Los resultados se contabilizaron asignando puntuaciones de 0 a 4,

considerando el 0 como ausencia de floculación y el 4 como floculación muy marcada (Watari y col., 1991).

14. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SEDIMENTACIÓN DE LAS LEVADURAS

100 mL del cultivo de levaduras en fase estacionaria en permeado se transfirieron a ampollas de decantación graduadas de 250 mL de capacidad, y se observó el desplazamiento del frente de sedimentación. Este desplazamiento se expresó como porcentaje del volumen que resultó clarificado. El tiempo de valoración de la sedimentación fue de 5 h a intervalos de 30 min. Al finalizar este periodo se pesaron los sedimentos resultantes de la centrifugación (4.520 g, 10 min) de los 50 mL inferiores de la ampolla, y se calcularon las tasas de recuperación con respecto a los pesos obtenidos en el tiempo 0 h.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. TRATAMIENTO AEROBIO DE PERMEADO DE SUERO LACTO-HIDROLIZADO CON FLORA DE AGUAS RESIDUALES URBANAS

1. 1. Hidrólisis con β -galactosidasa comercial

Para hidrolizar la lactosa del permeado, se utilizó un preparado comercial de lactasa de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact L 2.000), a concentraciones comprendidas entre 500 y 3.000 unidades de lactasa neutra (u.l.n.) por litro de permeado. Como puede verse en la Figura 16, a la concentración más alta de enzima empleada, se consiguió un 97% de hidrólisis tras 8 h de incubación a 30°C. La preparación de lactasa comercial no mostró pérdidas de actividad superiores al 15% de las cifras especificadas por el fabricante. Las menores concentraciones de calcio (inhibidor descrito de la lactasa de *K. lactis*) (Pivarnik y col., 1995) en suero que en leche (40 vs. 120) no parecen afectar significativamente al balance de la hidrólisis de lactosa en permeado.

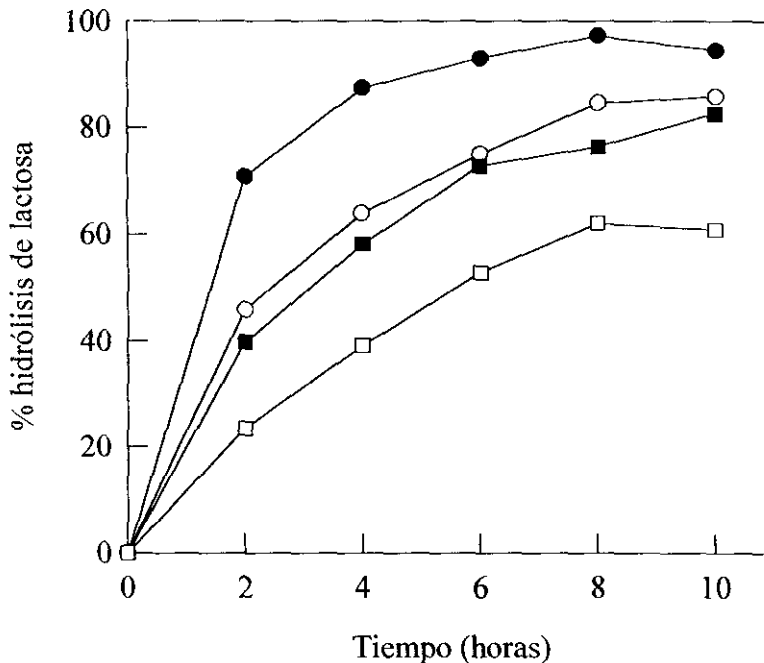


Figura 16. Evolución de la hidrólisis de la lactosa en permeado incubado a 30°C y 100 rpm con distintas concentraciones de β -galactosidasa (u.l.n./L): 500 (□), 1.000 (■), 1.500 (○) y 3.000 (●).

Varios autores han dado cifras de los porcentajes obtenidos de hidrólisis de lactosa en leche (Forsman y col., 1979) y permeados (Chiu y Kosikowski, 1985; Abril y Stull, 1989) tratados con concentraciones similares o superiores de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact); estas cifras pueden ser superiores al 80%, en tiempos de entre 4 y 5 h, lo que se considera industrialmente aceptable.

Chiu y Kosikowski (1985), para hidrolizar permeados dulces con 7,5-30% de lactosa y con concentraciones de enzima similares a las empleadas en nuestro ensayo (3.300 u.l.n./L de Maxilact LX 5.000), obtuvieron una hidrólisis del 95% a las 5 h a 40°C, en permeado con un 15% de lactosa y de un 90% con un 7,5% de lactosa.

Abril y Stull (1985), trabajando con lactasa procedente de *Kluyveromyces lactis* a concentraciones muy superiores a las nuestras (100.000 u.l.n./L) y con permeado concentrado (100 g/L de lactosa), obtuvieron porcentajes de hidrólisis de un 93% en menos de 4 horas a 33°C. Asimismo, Forsman y col. (1979), con concentraciones de entre 2.400 y 4.800 u.l.n. de enzima/L, obtuvieron entre un 80 y un 98% de hidrólisis en 5 h a 30°C, en leche UHT. Las temperaturas de incubación y/o las concentraciones de lactosa y lactasa empleadas por ambos grupos fueron superiores a las empleadas en nuestro estudio.

1. 2. Productos de la hidrólisis

También se estudió la evolución de la lactosa, galactosa y glucosa durante las 10 h de incubación del permeado con 3.000 u.l.n./L de Maxilact L 2.000, a 30°C (Figura 17). Durante el período de incubación se observó que a los tiempos intermedios las concentraciones de glucosa y galactosa no eran iguales, siendo siempre superior la de glucosa, con una diferencia de hasta el 20%. Las concentraciones de ambos monosacáridos se igualaron al cabo de las 10 h, en que la hidrólisis era completa.

Esa diferencia entre las concentraciones de glucosa y galactosa durante la hidrólisis podría deberse a la formación y luego hidrólisis de oligosacáridos. Como ya se indicó en la introducción la formación de oligosacáridos por transgalactosidación ha sido descrita por

numerosos autores durante la hidrólisis enzimática o ácida de la lactosa de la leche, del permeado o del suero.

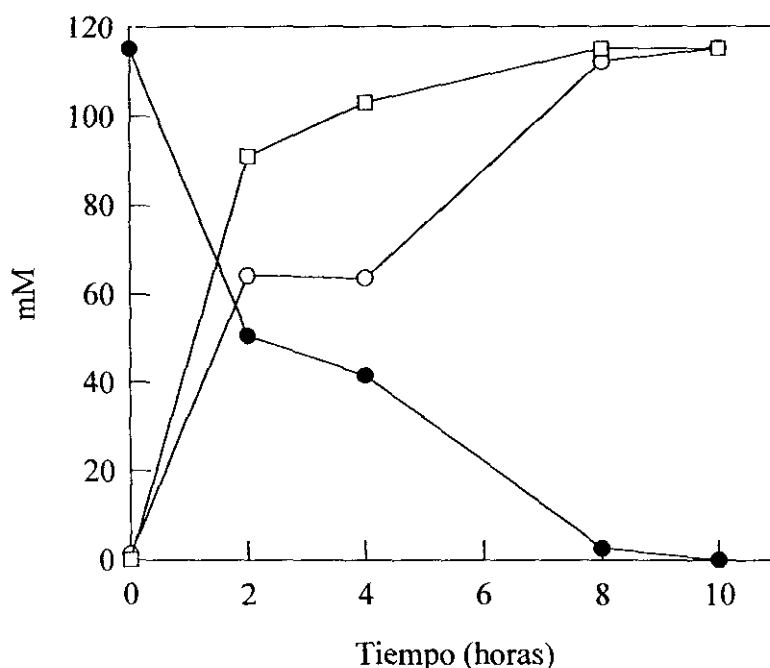


Figura 17. Evolución de la concentración de lactosa (●), galactosa (○) y glucosa (□) en permeado incubado con β -galactosidasa (3.000 u.l.n./L) a 30°C y 100 rpm.

Utilizando diferentes concentraciones de lactosa (6, 10 y 20%) y β -galactosidasa inmovilizada para hidrolizar permeado, López-Leiva y Guzman (1995) comprobaron que los oligosacáridos formados durante la hidrólisis con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* tienden a desaparecer, ya que a largos tiempos de incubación acaban siendo utilizados como sustratos e hidrolizados. La concentración de oligosacáridos depende del grado de hidrólisis. Cuando el grado de hidrólisis es bajo, inferior a un 80%, la formación de oligosacáridos es superior. Mozaffar y col. (1985) observaron que con porcentajes de conversión del 39% existía formación de un 5,5% de oligosacáridos, y que estos desaparecían cuando se alcanzaba el 80% de conversión.

Por el alto porcentaje de hidrólisis de lactosa conseguido y por la aparente ausencia de oligo-galactosacáridos, optamos por incubar el permeado durante 10 h con 3.000 u.l.n./L, en las condiciones descritas en Material y Métodos.

1. 3. Efecto de la hidrólisis del permeado sobre los cultivos aerobios con inóculo de aguas residuales

La hipótesis de trabajo era que la hidrólisis de la lactosa facilitaría globalmente el crecimiento microbiano (con el consiguiente descenso en la DQO del líquido), proporcionando sustratos más ampliamente utilizables que la lactosa y minimizando la acidificación causada por las bacterias lácticas. Para comprobarla, inoculamos el permeado hidrolizado con el conjunto de la flora microbiana presente en distintas muestras de aguas residuales urbanas, tomadas antes de tratar, a la entrada de dos plantas depuradoras de Madrid. Se trataba de comprobar hasta qué punto la hidrólisis modifica la selección de flora originada por la lactosa, cuando es la principal fuente de carbono del medio.

1. 3. 1. Efecto sobre la flora

A pesar de la presumible variedad de la flora de las aguas residuales urbanas, la mayor parte de los microorganismos en nuestras muestras resultaron ser bacterias coliformes, y así siguió siendo hasta el final de la incubación, independientemente de que la lactosa del permeado usado como medio de cultivo, se hidrolizase o no. En los cultivos inoculados con agua residual recibida por la depuradora Valdebebas (Figura 18), el número de microorganismos totales y bacterias coliformes fue inicialmente, de 1×10^7 y 7×10^6 ufc/mL, respectivamente, alcanzando ambos recuentos niveles de 10^9 ufc/mL al llegar a la fase estacionaria, tras 10 h de incubación.

En los cultivos inoculados con las aguas de entrada de la depuradora de La China, la proporción inicial de bacterias coliformes respecto a totales fue algo inferior que en el caso

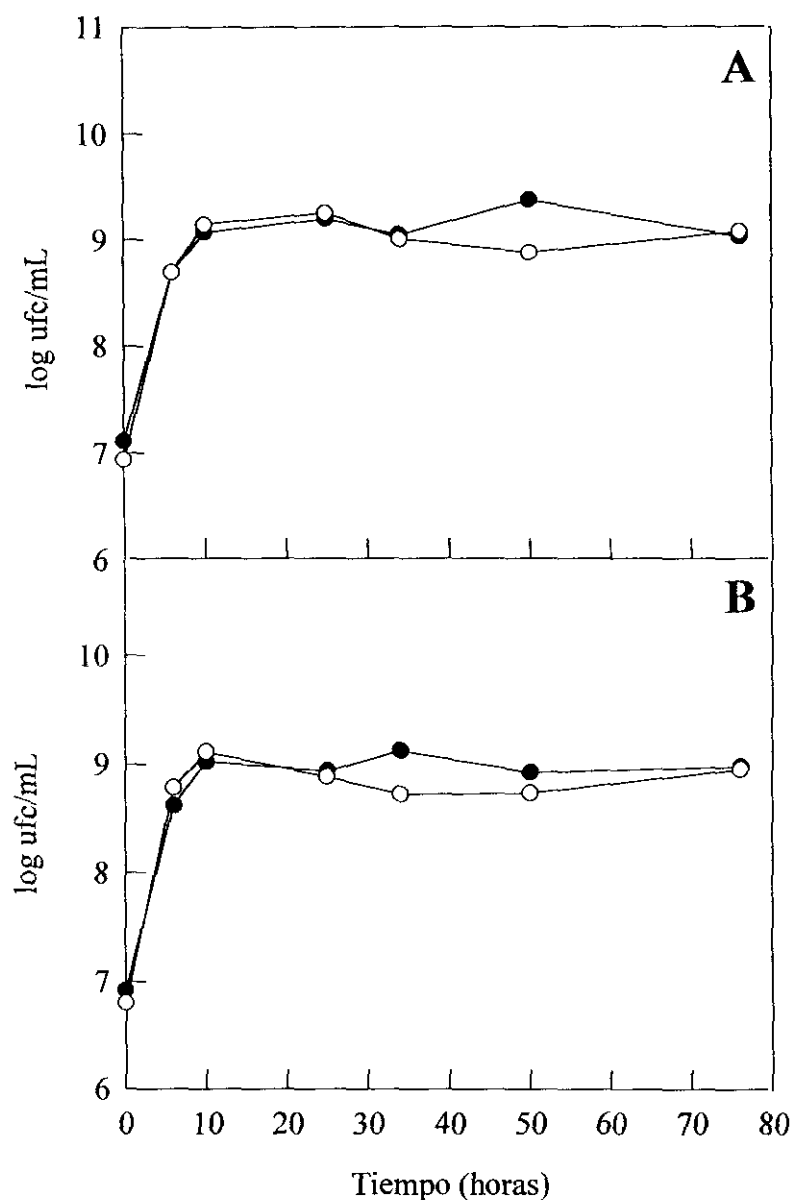


Figura 18. Recuentos de microorganismos totales (●) y bacterias coliformes (○) durante el cultivo de la flora del agua residual de la depuradora Valdebebas en el permeado control (A) y en el permeado con la lactosa hidrolizada (B) a 30°C y 150 rpm.

de Valdebebas (Figuras 18 y 19). También fue algo menor la proporción final, pero la hidrólisis del permeado apenas influyó sobre la evolución de las poblaciones microbianas.

Las aguas residuales urbanas suelen tener un elevado contenido de heces humanas y animales, bastante ricas en microorganismos coliformes (2×10^9 coliformes/persona/día) (Bitton, 1994). Mientras que aproximadamente el 99% de las bacterias de la flora intestinal son anaerobias obligadas (Berg, 1996), hay una pequeña fracción que sólo son anaerobias facultativas y entre ellas están las Enterobacterias y los Lactobacilos. Así pues, en las aguas residuales, ricas en heces pero expuestas al oxígeno, sólo sobreviven esas fracciones facultativamente anaerobias y en particular, dentro de las Enterobacterias, las coliformes. Éstas, básicamente *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, por efecto de la selección, pasan de constituir un 0,02% de la flora de las heces a más del 50% en las aguas residuales urbanas (Sanford, 1982).

Aunque se ha analizado bastante detalladamente la flora de los fangos (aerobios y anaerobios) de las depuradoras, son pocos los trabajos realizados sobre caracterización microbiológica de las aguas residuales brutas, antes de la depuración. Los estudios de Jiménez y Landa (1998), que analizaron las aguas procedentes de diversos puntos del alcantarillado de la ciudad de Méjico, y los de otros autores que también han caracterizado la flora de las aguas de entrada de las depuradoras urbanas (Prakasam y Dondero, 1967; Ramos-Cormenzana y col., 1994), coinciden básicamente con nuestros resultados sobre el agua de entrada de Valdebebas, tanto para microorganismos totales, como para bacterias coliformes.

Nuestra conclusión es que, dada la abundancia de coliformes en estas aguas y la posibilidad de inducir lactasa de estas bacterias, la hidrólisis de la lactosa tiene poco efecto sobre la selección de la flora de aguas residuales. Es de presumir que el metabolismo (o la supervivencia) de los microorganismos no coliformes, acompañantes pero no muy abundantes, dependa más estrechamente de la presencia de lactosa que el de las coliformes, pero su desaparición solo sería apreciable en aguas relativamente limpias o al menos con pocos restos fecales. También es posible que la presencia de células microbianas no viables (las anaerobias obligadas mayoritarias en las heces) presentes en nuestro inóculo y lisadas

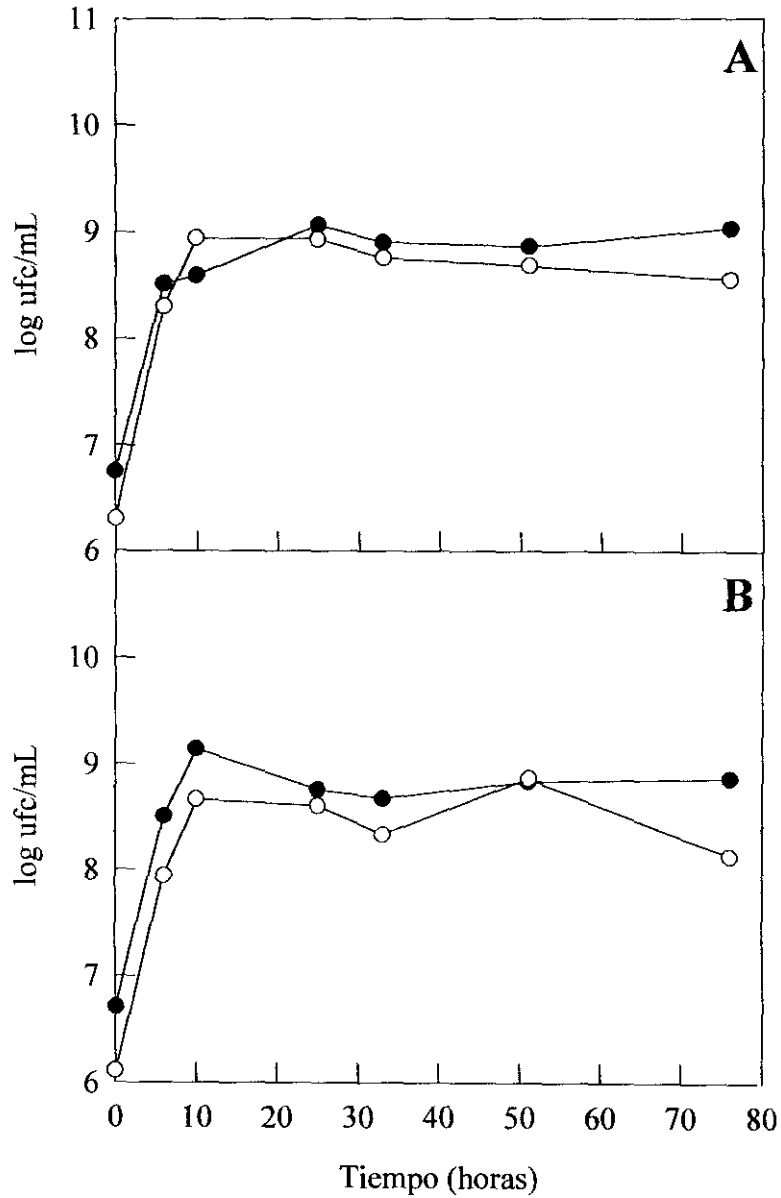


Figura 19. Recuentos de microorganismos totales (●) y bacterias coliformes (○) durante el cultivo de la flora del agua residual de la depuradora La China en el permeado control (A) y en el permeado con la lactosa hidrolizada (B) a 30°C y 150 rpm.

durante el cultivo, pueda servir a todo tipo de organismos como fuente de nutrientes, quitando a la lactosa parte de su poder selectivo.

1. 3. 2. Efecto sobre las fuentes de C y la DQO

En la Figura 20 se muestra la evolución de la DQO durante el cultivo, del permeado control y del permeado hidrolizado, con inóculo de Valdebebas. Como puede verse, en 76 h la DQO del permeado control se redujo en un 29% y en un 37% la del permeado hidrolizado. Cuando analizamos la evolución de los azúcares a lo largo de esos cultivos, comprobamos que la lactosa del permeado control sólo había sido consumida en un 50% después de los 3 días (Figura 21 A). En el permeado con la lactosa hidrolizada, por el contrario, los microorganismos consumieron toda la glucosa en las primeras 24 h, y sólo después de agotar este azúcar comenzaron a utilizar la galactosa, que al final del cultivo habían consumido totalmente (Figura 21 B).

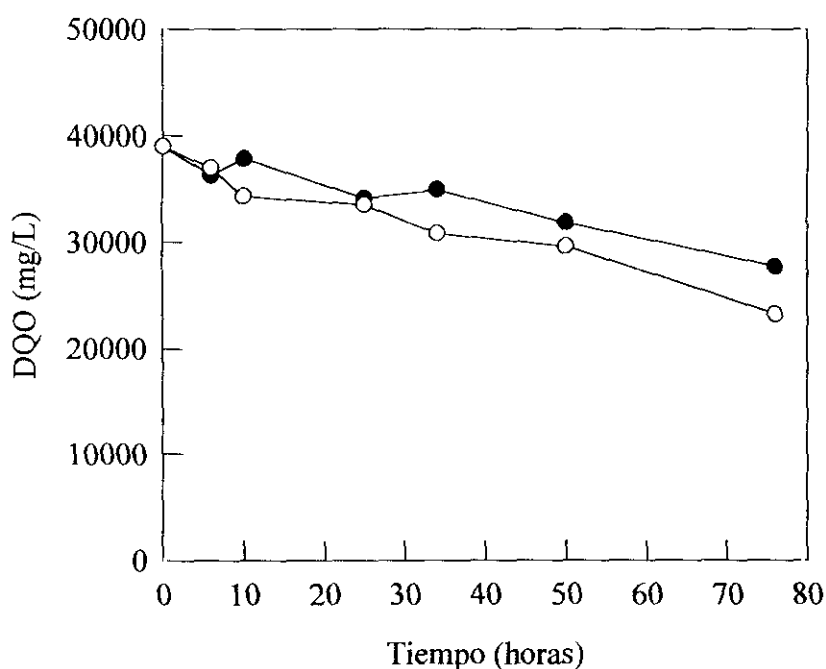


Figura 20. DQO del permeado control (●) y del permeado con la lactosa hidrolizada (○) durante el cultivo (a 30°C y 150 rpm) de la flora del agua residual de Valdebebas.

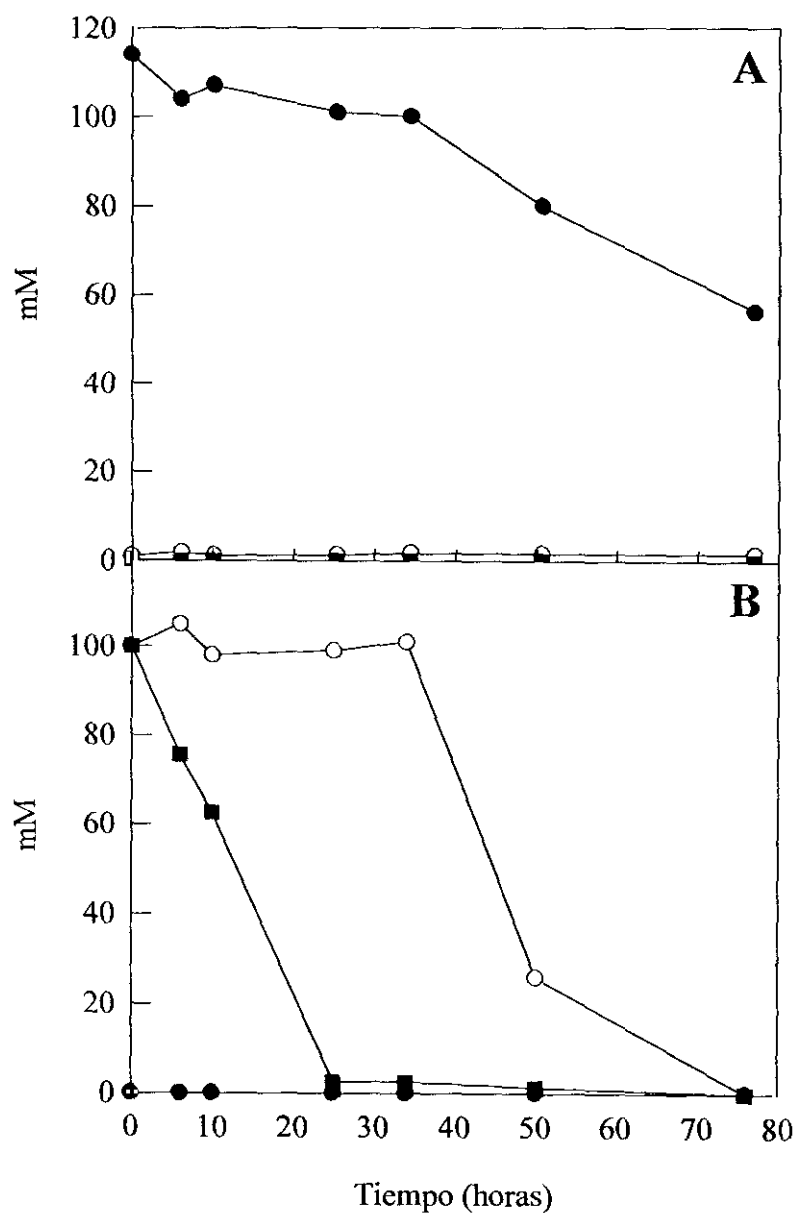


Figura 21. Concentración de lactosa (●), galactosa (○) y glucosa (■) del permeado control (A) y del permeado con la lactosa hidrolizada (B) durante el cultivo (a 30°C y 150 rpm) de la flora del agua residual de Valdebebas.

En el caso de los cultivos con inóculo de la depuradora de La China (Figura 22), el descenso de la DQO de los sobrenadantes tras el cultivo, fue del 21% para el permeado control y del 45% para el hidrolizado. Es probable que esa mayor diferencia en la caída de la DQO de los cultivos de La China se deba a la menor proporción de bacterias coliformes en esas aguas, o en otras palabras, al mejor crecimiento de las bacterias no-coliformes, facilitado por la hidrólisis.

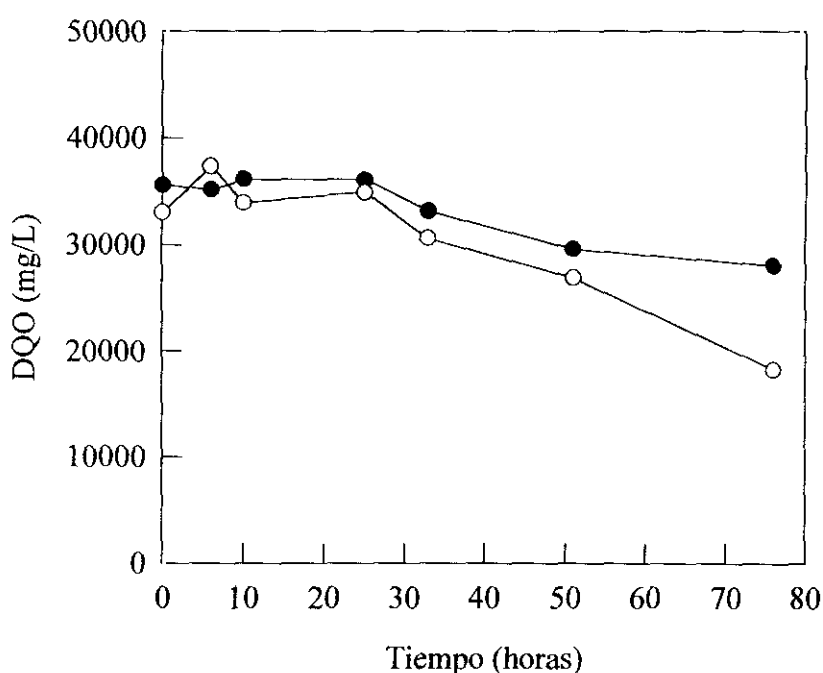


Figura 22. DQO del permeado control (●) y del permeado con la lactosa hidrolizada (○) durante el cultivo (a 30°C y 150 rpm) de la flora del agua residual de La China.

En la Figura 23 se muestra la evolución de las concentraciones de azúcares en los cultivos con inóculo de La China. También en este caso, como en el presentado en la Figura 21, puede verse que con el tamaño de inóculo y los tiempos de incubación empleados, apenas se llega a consumir la mitad de la lactosa disponible en los permeados no hidrolizados. También coinciden en líneas generales los perfiles de consumo de la glucosa y la galactosa. La velocidad de consumo de la galactosa aumenta al agotarse la glucosa.

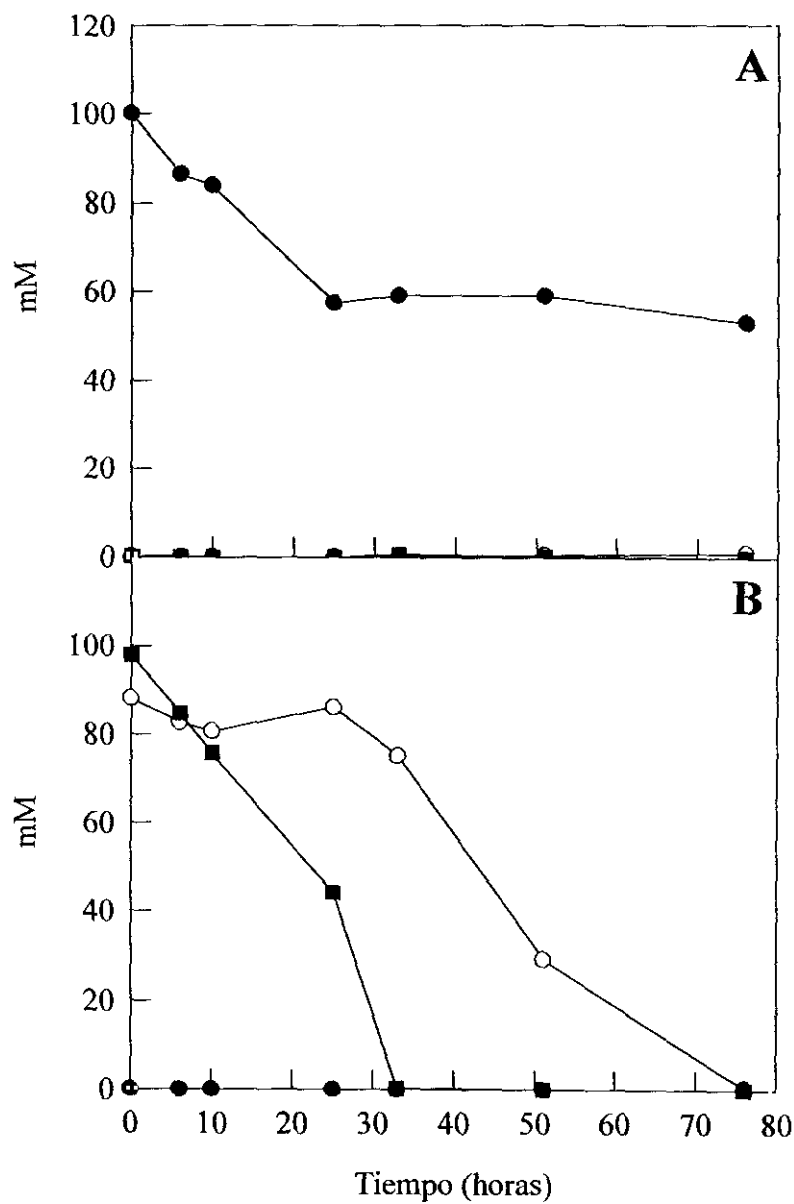


Figura 23. Concentración de lactosa (●), galactosa (○) y glucosa (■) del permeado control (A) y del permeado con la lactosa hidrolizada (B) durante el cultivo (a 30°C y 150 rpm) de la flora del agua residual de La China.

La escasa diferencia en pérdida de DQO en los cultivos con flora residual del permeado control y el hidrolizado parece atribuible a la elevada proporción en el inóculo de bacterias coliformes, en las que se puede inducir lactasa. Es posible que con otro tipo de inóculo, menos rico en aguas fecales, la diferencia en la velocidad de descenso de la DQO por efecto de la hidrólisis de la lactosa, fuera mayor.

El descenso poco pronunciado de la DQO, con o sin hidrólisis de lactosa, siendo este azúcar, o los monosacáridos derivados, la principal fuente de carbono del medio, sugiere una utilización incompleta de estos sustratos, que podrían metabolizarse parcialmente de forma anaerobia. Fournier y col. (1993), trabajando en continuo con permeado inoculado con fangos y estiércol de ternera, advirtieron un consumo incompleto de la lactosa que en su caso atribuyeron a una posible limitación de fuentes de nitrógeno.

Una razón frecuentemente barajada para explicar bajas velocidades de caída de la DQO, es la corta exposición de la flora de las aguas residuales a los sustratos allí presentes. Las aguas residuales brutas, compuestas por aguas de procedencia variable, conllevan una gran diversidad de flora que no ha tenido tiempo para adaptarse al medio (Prakasam y Dondero, 1967). Ésto hace que esta flora sea a corto plazo ineficaz para reducir la DQO, y que cualquier circunstancia adversa, como un pH muy bajo, pueda entorpecer su crecimiento.

Las bajadas muy acusadas del pH producidas durante los cultivos en suero lácteo, han sido atribuidas a la formación de diversos ácidos orgánicos (Kisaalita y col., 1987; Bitton, 1994). Burgess (1985), trabajando con efluentes ricos en lactosa en un reactor de anaerobiosis de 2 fases, advirtió que la fase acidogénica es tan rápida que en poco tiempo (24 h) el 50% de la DQO está en forma de ácidos. Estos bajos valores de pH podrían ser los causantes del retraso en el crecimiento del cultivo en permeado con la lactosa hidrolizada, así como de la baja reducción de la DQO en este caso y en el control, siendo la formación de ácidos menos acusada en los cultivos control porque el consumo de la lactosa es más lento.

La escasa magnitud del descenso de la DQO puede en principio ser atribuible al efecto limitante de una insuficiente concentración de O₂, fuentes de N y oligonutrientes.

Kato y Tanaka (1998) señalan que la pobre transferencia de O_2 que tiene lugar en los cultivos en matraz, así como la acumulación de CO_2 , acerca a los cultivos a condiciones de anaerobiosis. De existir condiciones de microaerofilia se favorecería el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos. Podría ser pues que involuntariamente se hubiera orientado el proceso hacia una fermentación acidogénica, en la que los microorganismos transformasen los azúcares en ácidos o en otros compuestos que al permanecer solubles en el medio, impiden que la DQO descienda. Las bacterias acidogénicas utilizan la lactosa del suero con extremada rapidez, causando una considerable bajada de pH, debido a la formación de ácidos (Yu y Pinder, 1993a; Ghaly, 1996). Esta acidificación provoca la inhibición de la flora metanogénica, por lo que la separación del proceso anaerobio en 2 fases se ha descrito como la solución para el tratamiento de los sueros (Cohen y col., 1984; Kisaalita y col., 1987; Fournier y col., 1993; Yu y Pinder, 1993a).

1. 3. 3. Efecto de la regulación del pH sobre la DQO

Los bajos valores de pH alcanzados por los cultivos en permeado de flora residual (Figura 24), pueden en principio condicionar el crecimiento de determinados microorganismos, sobre todo en el caso del permeado hidrolizado. Para estudiar el efecto del pH, cultivos en permeado hidrolizado inicialmente iguales fueron ajustados a varios valores de pH como se muestra en la Tabla 16. El ajuste de pH se realizó manualmente, a intervalos de 4 horas con NaOH 1N, observándose rápidos descensos entre dichos intervalos.

En la Tabla 16 se muestran los recuentos, a las 76 h de cultivo, de los microorganismos totales y las bacterias coliformes y lácticas de esos cultivos mantenidos a diferentes pHs. No se apreciaron grandes diferencias cuantitativas de microorganismos totales, coliformes o bacterias lácticas, a ninguno de los valores de pH empleados. Las bacterias lácticas presentaron cifras de concentración similares a las de las coliformes en la mayoría de los casos. A pH 5 o inferior y en los cultivos no regulados, sin embargo, las cifras de lácticas superaron claramente a las de coliformes.

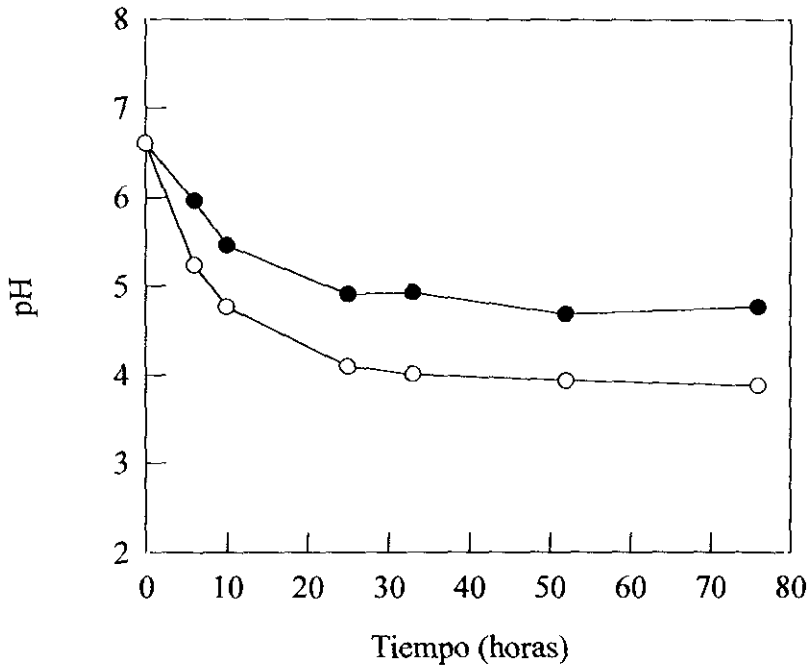


Figura 24. pH del permeado control (●) y del permeado con la lactosa hidrolizada (○) durante el cultivo (a 30°C y 150 rpm) de la flora del agua residual de La China.

Tabla 16. Efecto de la regulación del pH del permeado con la lactosa hidrolizada en el recuento de microorganismos totales y de bacterias coliformes y lácticas¹, durante el cultivo de la flora del agua residual de La China a 30°C y 150 rpm a las 76 h de incubación.

pH	Totales	Coliformes	Lácticas
Sin regular	3 x 10 ⁸	8,8 x 10 ⁷	4 x 10 ⁸
7	1,3 x 10 ⁹	5 x 10 ⁸	6,1 x 10 ⁸
6,5	1,2 x 10 ⁹	7 x 10 ⁸	9,3 x 10 ⁸
6	1,3 x 10 ⁹	6,7 x 10 ⁸	8,1 x 10 ⁸
5,5	4,3 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸
5	8 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁸
4,5	7 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	4,9 x 10 ⁸

¹ Las bacterias lácticas se determinaron con agar MRS-S.

No se observó una clara variación en cuanto al descenso de la DQO en ninguno de los cultivos a pH regulado con relación al cultivo control (Tabla 17), pudiéndose atribuir las ligeras variaciones observadas a la sensibilidad del método de determinación de la DQO, más que al efecto de la regulación del pH.

Tabla 17. Efecto de la regulación del pH en la DQO del permeado con la lactosa hidrolizada durante el cultivo de la flora del agua residual de La China a 30°C y 150 rpm a las 76 h de incubación. (DQO inicial= 36.000 mg/L).

pH	DQO (mg/L)	% de reducción de la DQO inicial
Sin regular	24.803	31
7	21.650	39
6,5	23.736	34
6	21.759	39
5,5	22.564	37
5	24.913	31
4,5	22.546	37

Los tratamientos biológicos, por regla general, se suelen realizar a pH neutro (Bitton, 1994). Se estima normalmente que los pHs muy ácidos favorecen un crecimiento excesivo de microorganismos no deseables de baja especificidad y poca estabilidad (Schroder y De Haast, 1989; Ghaly, 1996), que pueden inhibir el metabolismo de las bacterias metanogénicas en los tratamientos anaerobios (Ghaly, 1996). El efecto del pH en la acidogénesis a partir de glucosa ha sido estudiado por Zoetemeyer y col. (1982), que a diferencia de los resultados obtenidos en nuestro estudio, sí encontraron variaciones notables en el crecimiento de los microorganismos totales al modificar el pH, con resultados máximos a pH entre 5,8 y 6,2. También observaron diferencias cualitativas y cuantitativas en la formación de ácidos orgánicos.

1. 3. 4. Efecto de la suplementación con hierro sobre la DQO

Dado que el oligonutriente más obviamente escaso en la leche, y por tanto en el permeado, es el hierro (Glass y Hedrick, 1977b), que es particularmente crítico para el metabolismo aerobio de los microorganismos, probamos a suplementar los permeados con este oligoelemento, para mejorar el metabolismo aerobio y así reducir más la DQO del medio libre de células.

El contenido habitual de hierro del permeado, que dependen del procedimiento de elaboración del queso y del tamaño de poro de las membranas de ultrafiltración, oscila entre 4,1 y 16 μM (Zall, 1992). Para favorecer el crecimiento aerobio del inóculo, optamos por suplementar un permeado con la lactosa hidrolizada con cloruro férrico 0,1 mM, lo que no modificó sustancialmente el crecimiento total de microorganismos, como puede observarse en la Tabla 18. Tampoco las diferencias en velocidad de consumo de galactosa (Tabla 18) son significativas.

Tabla 18. Evolución de los microorganismos totales y de la concentración de galactosa en el permeado con la lactosa hidrolizada, durante el cultivo de la flora del agua residual de Valdebebas suplementado con cloruro férrico 0,1 mM.

Tiempo (horas)	Control		Con suplemento	
	Microorganismos totales (ufc/mL)	Galactosa (mM)	Microorganismos totales (ufc/mL)	Galactosa (mM)
0	$1,2 \times 10^8$	107	$1,2 \times 10^8$	107
47	-	81	-	85
66	$2,7 \times 10^9$	63	$2,2 \times 10^9$	71

En la Figura 25 se muestra como la DQO del cultivo suplementado con hierro desciende sólo ligeramente más que la del control, con unos porcentajes de reducción de un 52 y 64% para los cultivos sin y con suplemento, respectivamente.

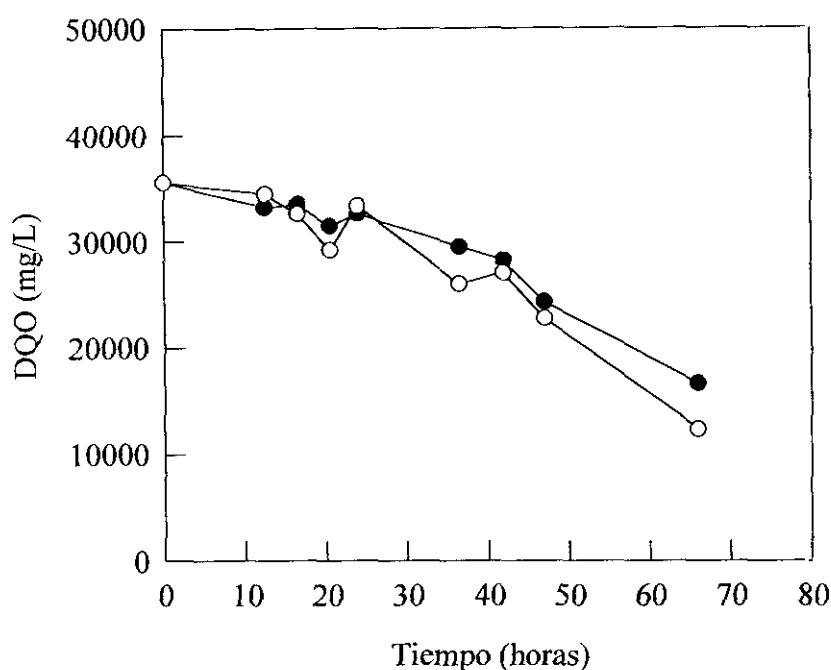


Figura 25. DQO del permeado con la lactosa hidrolizada (●) y del mismo permeado suplementado con cloruro férrico 0,1 mM (○) durante el cultivo de la flora del agua residual de Valdebebas a 30°C y 150 rpm.

El descenso (52%) de la DQO en el control a las 67 h, de la Figura 25, bastante mayor que el del 37% de la Figura 20 antes comentada, es atribuible a una mayor concentración de inóculo de partida (1 orden de magnitud superior) (Figura 18 y Tabla 18) y a la gran variabilidad y diversidad de la flora en las distintas muestras de aguas residuales brutas incluso en el mismo punto de toma (Prakasam y Dondero, 1967).

1. 3. 5. Formación de ácidos orgánicos, etanol y glicerol

El descenso pronunciado del pH en los cultivos de permeado hidrolizado inoculado con agua residual y la escasa reducción de la DQO en esos cultivos, nos llevó a comprobar la presencia de posibles productos de fermentación. Habiéndose detectado sensorialmente fuertes aromas avinagrados y dado que bacterias coliformes como *E. coli* son H₂-acetogénicas (Yang y col., 1988), analizamos la formación de ácido acético. Como anteriormente habíamos observado que las bacterias lácticas constituían una fracción importante de la población microbiana en estos cultivos, comprobamos también la formación de ácido L-láctico.

En la Figura 26 C se muestran las concentraciones de estos dos ácidos orgánicos a lo largo del cultivo en el permeado control. A medida que fue disminuyendo el pH (Figura 26 A) y la concentración de lactosa (Figura 26 B), comenzaron a aparecer pequeñas cantidades de ácido acético que llegaron a 20 mM a las 32 h de cultivo. Las concentraciones de ácido L-láctico registradas fueron muy inferiores, a pesar de que la población de bacterias lácticas llegó a 10^8 ufc/mL.

La Figura 27 muestra los resultados obtenidos en el cultivo en permeado con la lactosa hidrolizada. La evolución de los microorganismos totales y de las bacterias lácticas se muestra en la Figura 27 A, donde también puede verse el rápido descenso del pH a lo largo del cultivo, hasta 3,5. La concentración de ácido láctico acumulado en este caso es similar a la observada en el cultivo control, igual que el nivel alcanzado por las bacterias lácticas. Sin embargo, a diferencia del cultivo control y paralelamente al descenso de pH, se observa un gran incremento en la concentración de ácido acético que alcanza su máxima concentración, cerca de 60 mM, al final del cultivo (Figura 27 C).

A continuación, intentamos caracterizar otros compuestos formados a lo largo de los cultivos, buscando especialmente ácido butírico y propiónico. Para ello, se realizó un análisis, por cromatografía de gases y espectrometría de masas, del sobrenadante al final de los cultivos en permeado control y con la lactosa hidrolizada. En la Figura 28 se muestran los correspondientes cromatogramas. El pico 1 en ambos casos corresponde al ácido

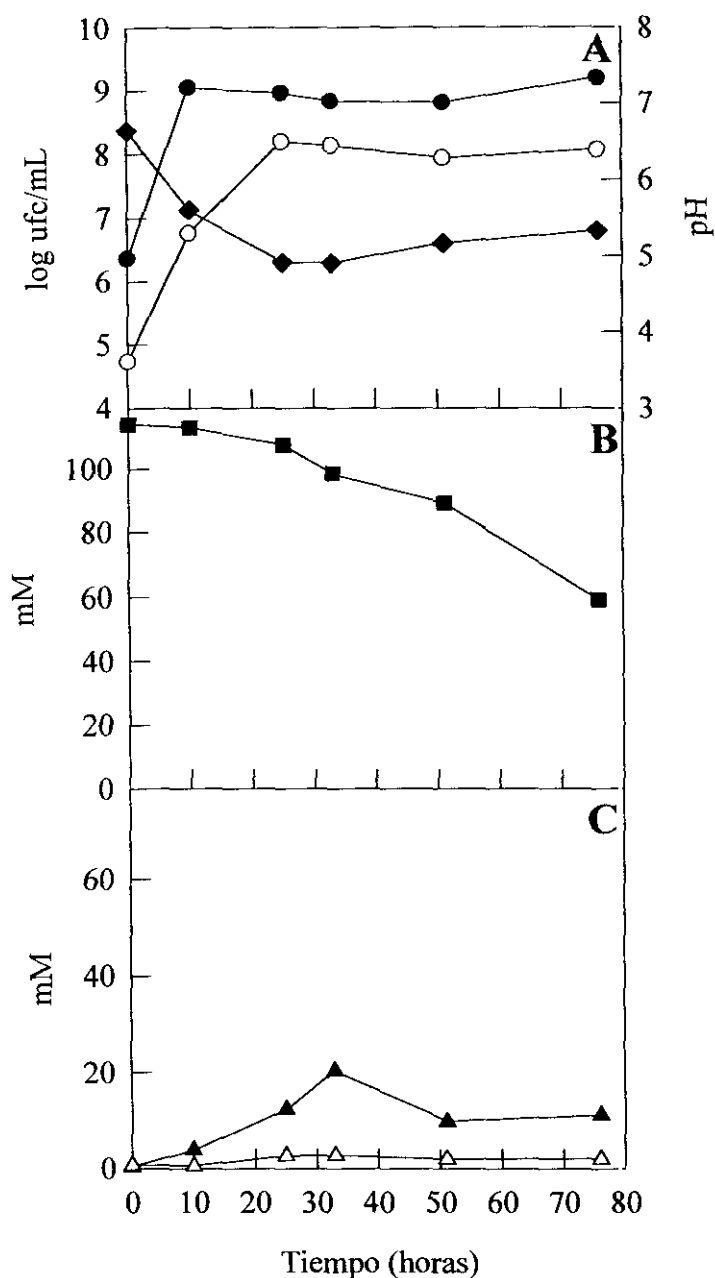


Figura 26. Recuentos de microorganismos totales (●), bacterias lácticas (○) y evolución del pH (◆) en el permeado control durante el cultivo de la flora del agua residual de La China a 30°C y 150 rpm (A). Concentración de lactosa (■) en el mismo cultivo (B). Concentración de ácido acético (▲) y ácido láctico (△) en el mismo cultivo (C).

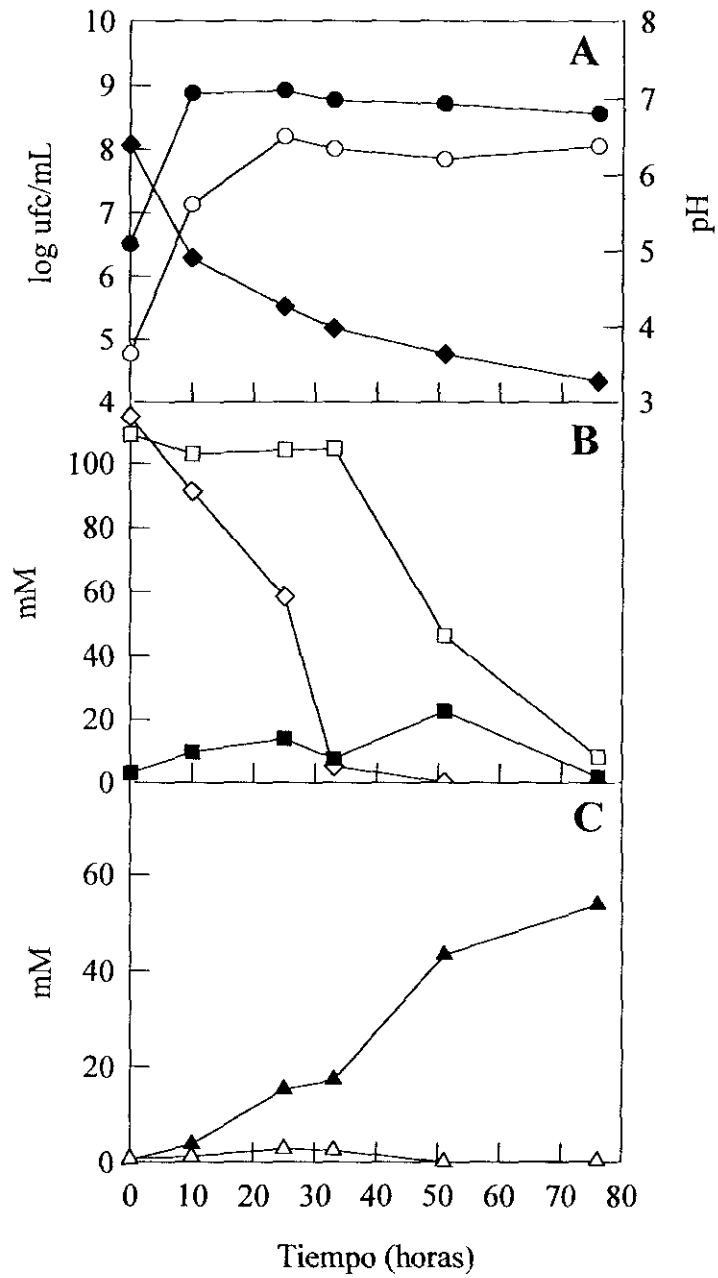


Figura 27. Recuentos de microorganismos totales (●), bacterias lácticas (○) y evolución del pH (◆) durante el cultivo de la flora del agua residual de La China en el permeado con la lactosa hidrolizada a 30°C y 150 rpm (A). Concentración de lactosa (■), galactosa (□) y glucosa (◇) en el mismo cultivo (B). Concentración de ácido acético (▲) y ácido láctico (△) en el mismo cultivo (C).

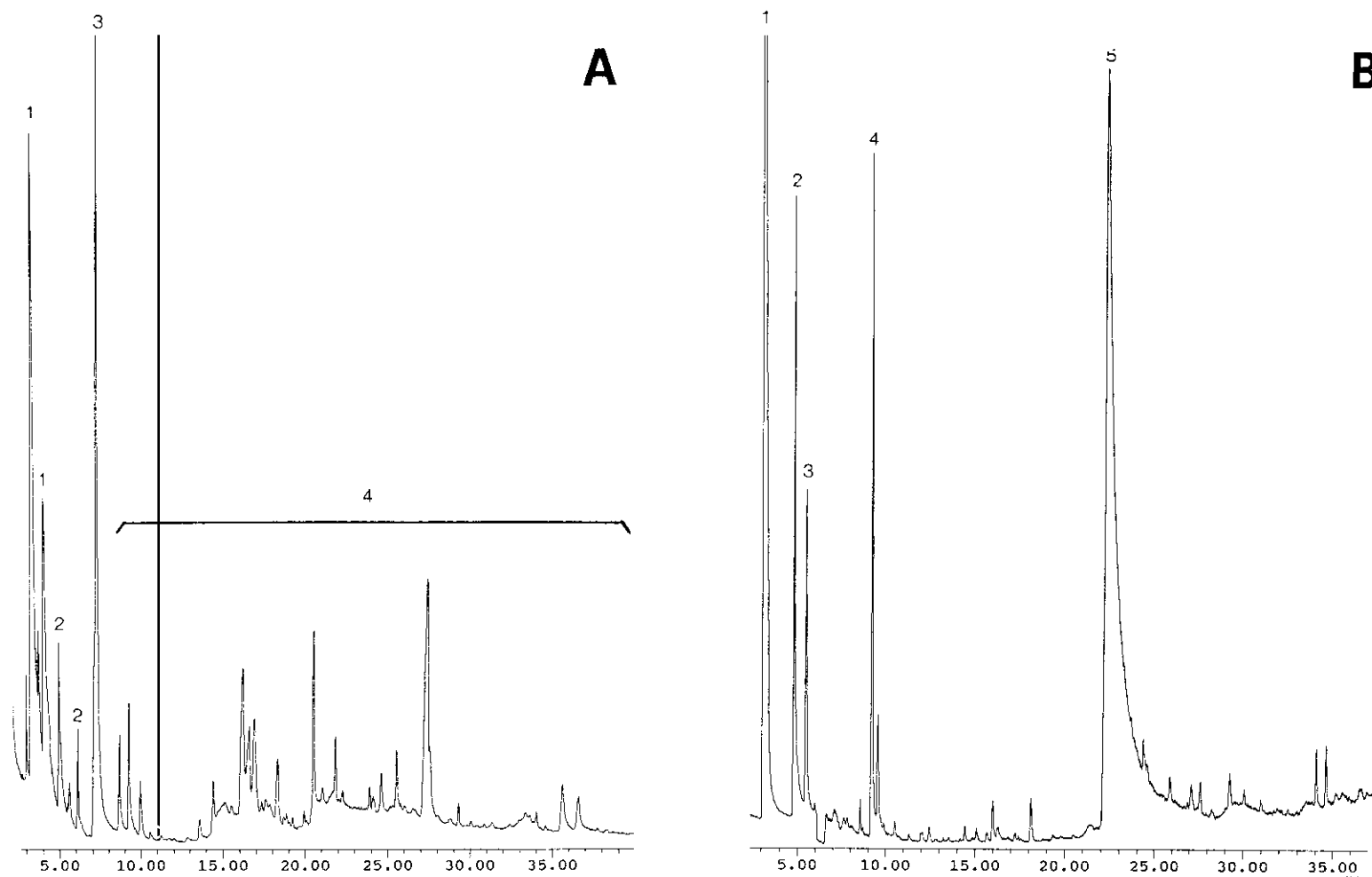


Figura 28. Perfil cromatográfico de los compuestos presentes en (A) permeado control y (B) permeado lactohidrolizado. 1. Acético, 2. Butanodiol, 3. Furanometanol, 4. Furanos y piranos, y 5. Glicerol.

acético. En ninguno de los dos cultivos se observó formación de ácido butírico, ni de propiónico. Como se aprecia en la Figura 28 B, el permeado con la lactosa hidrolizada mostró significativas cantidades de glicerol (pico 5), ausentes en el cultivo en el permeado control. En la muestra procedente del cultivo en permeado control se observa la presencia de numerosos picos identificados como furanos y piranos (pico 4), procedentes de la descomposición de la lactosa durante el proceso de inyección de las muestras, hecho que se comprobó mediante el análisis cromatográfico del permeado no inoculado.

Para corroborar este estudio, se determinaron por métodos enzimáticos los compuestos que se muestran en la Tabla 19. Así, se comprobó nuevamente una mayor producción de ácido acético en los cultivos en permeado hidrolizado, así como cantidades notables de glicerol y etanol, no detectables en el permeado control. Las concentraciones de ácido láctico, sin embargo, fueron similares en el cultivo con permeado hidrolizado y en el control.

Tabla 19. Concentraciones de distintos compuestos de bajo peso molecular determinados por métodos enzimáticos, en el permeado control y con la lactosa hidrolizada, tras 76 h de incubación a 30°C con la flora del agua residual de la depuradora de La China.

Compuestos de bajo peso molecular (mM)	Permeado control	Permeado con la lactosa hidrolizada
Lactosa	89,3	1,1
Galactosa	1,7	0,3
Glucosa	< 0,001	< 0,001
Acido acético	46,9	72,9
Acido láctico	2,9	2
Glicerol	< 0,02	5,6
Etanol	0,1	1,8

Todas las coliformes y bastantes cepas de enterobacterias son capaces de inducir la síntesis de lactasa en presencia de lactosa, pero muchas menos son capaces de producir ácidos creciendo sobre este azúcar. Todas las enterobacterias, sin embargo, producen ácidos (pirúvico, láctico, acético, fórmico y succínico, en muy distintas proporciones) y algunos gases (CO_2 y H_2) al crecer sobre glucosa.

La formación de ácido acético ha sido estudiada en cultivos en suero (Chartrain y Zeikus, 1986a y 1986b; Ghaly, 1996), permeado (Fournier y col., 1993), efluentes lácteos (Burgess, 1985) y otros medios con lactosa (Kisaalita y col., 1987 y 1989) inoculados con flora de fangos de depuradora en condiciones de anaerobiosis al menos parcial. Se ha observado así, la acumulación de distintas concentraciones de ácido láctico, etanol y de ácido butírico, propiónico y fórmico, además del acético (Burgess, 1985; Chartrain y Zeikus, 1986a y 1986b; Kisaalita y col., 1987 y 1989; Fournier y col., 1993; Sorlini y col., 1993; Ghaly, 1996). El pH del medio (Kisaalita y col., 1987; Ghaly, 1996), el contenido en lactosa (Yu y Pinder, 1993a) y el origen de la flora utilizada para el tratamiento (Chartrain y Zeikus, 1986a y 1986b; Yang y col., 1988; Fournier y col., 1993), entre otros factores, hacen que predomine la formación de unos ácidos sobre la de otros.

Varios autores que han estudiado la fermentación acidogénica con flora de fangos sobre soluciones de glucosa, detallan la producción de acético en cantidades importantes (Zoetemeyer y col., 1982; Gómez y Goma, 1986; Fynn y Syafila, 1990). Sin embargo, también describen la formación de los ácidos orgánicos mencionados en el párrafo anterior como productos finales de la fermentación de la lactosa (Zoetemeyer y col., 1982; Gómez y Goma, 1986; Fynn y Syafila, 1990).

De los resultados expuestos en las Figuras 26, 27 y 28, y de la Tabla 19 puede deducirse que, con los inóculos de flora de aguas residuales utilizados, la hidrólisis previa de la lactosa del permeado comporta una aceleración considerable de la formación de ácidos orgánicos y alcoholes. En las muestras tomadas a las 76 h de cultivo reseñadas en la Tabla 19, la hidrólisis supone un aumento del 55% en la concentración de acético, de un 1.800% en la de etanol y más del 28.000% en la de glicerol. Es presumible que el láctico no se acumule porque a medida que se vaya formando, sirva como sustrato a la fracción

acetogénica de la flora presente (esto se sugiere en parte en la Figura 26 C). Es probable por otra parte que, sobre todo en los cultivos con la lactosa hidrolizada, se hayan perdido ciertas cantidades de componentes volátiles (diversos ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas y CO₂) que en nuestras condiciones de aireación no permanecen disueltos en los medios de cultivo.

Respecto a las condiciones de aireación, parece ser que en nuestro caso, con la simple agitación de los matraces, el O₂ es limitante y los cultivos desarrollan un metabolismo parcialmente anaerobio. Por eso los productos finales pueden hasta cierto punto compararse con los del tratamiento anaerobio del suero que han estudiado diversos autores. La mayoría de ellos coinciden en que con la flora de fangos, la mayor parte de la lactosa se transforma, en las primeras fases del proceso (fases hidrolítica y acidogénica) en ácido láctico (Pipyn y Verstraete, 1981; Chartrain y Zeikus, 1986a). De hecho, Kisaalita y col. (1989) proponen al láctico como mejor indicador para optimizar esa fase del proceso anaerobio. Con la hidrólisis enzimática de la lactosa suplimos la fase o función hidrolítica que en los tratamientos anaerobios llevan a cabo consorcios de diversos microorganismos, y que según Bitton (1994) es limitante para la velocidad del conjunto del proceso.

La fase acidogénica, continuación de la hidrolítica y realizada en los fangos por distintos tipos de bacterias, entre ellos *Clostridium*, está en nuestro caso a cargo sobre todo de enterobacterias y bacterias lácticas, como se deduce de la Tabla 16. Muchas de las enterobacterias pueden, en un régimen de fermentación mixta, dar lugar a lactato, etanol, acetato, formato, succinato, y otros productos similares a los de las bacterias lácticas heterofermentativas.

Es prácticamente imposible comparar los rendimientos en ácidos orgánicos de nuestro proceso, con aireación y registrando sólo los compuestos solubles, con los de los autores que trabajan en condiciones anaerobias con fangos, como Fournier y col. (1993) o Chartrain y Zeikus (1986a), pero cualitativamente las transformaciones registradas son similares. Nuestro proceso, con hidrólisis enzimática de la lactosa y con flora sólo parcialmente anaerobia (de agua residual), es hasta cierto punto comparable al de las fases hidrolítica y acidogénica del procesado anaerobio de lactosa, con la flora de fangos.

A continuación de la acidogénesis tiene lugar, en el esquema de la cadena trófica de los tratamientos de depuración anaerobios, la acetogénesis, consistente en la formación de acetato, CO_2 y H_2 a cargo de determinados grupos de bacterias que utilizan como sustrato el ácido láctico y otros ácidos orgánicos. Es probable que tengamos flora acetogénica en nuestras muestras, tanto de los cultivos en permeado control como de los de permeado hidrolizado, ya que en ambos se produce acetato.

El descenso de pH que tiene lugar por acumulación en el medio de los productos de la flora acidogénica y metanogénica, es desfavorable para la producción de CH_4 por parte de la flora metanogénica, último escalón de la cadena trófica anaerobia, de la que depende la valorización energética del proceso.

Kisaalita y col. (1987) y Ghaly (1996) proponen por esa razón y para el tratamiento anaerobio del suero, realizar en fermentadores separados la fase metanogénica para poder regular el pH y maximizar la producción de acetato en una primera fase y de metano en la segunda.

Es posible pues que nuestro proceso, con la hidrólisis enzimática y con flora de aguas residuales en condiciones parcialmente aerobias pueda constituir una alternativa a la primera fase del tratamiento anaerobio. Es probable, sin embargo, que la proporción de enterobacterias en el inóculo sea un factor fundamental en el resultado global del proceso.

2. UTILIZACIÓN DE LEVADURAS COMO PRETRATAMIENTO EN LA DEPURACIÓN DE SUERO Y DE SU PERMEADO

2. 1. Evaluación y adaptación de métodos

2. 1. 1. *Elección de medios selectivos para recuentos de levaduras y bacterias lácticas*

Para el aislamiento de cepas de levaduras a partir de efluentes de quesería, es preciso utilizar medios y condiciones selectivas que permitan el crecimiento de levaduras e impidan el de mohos y bacterias. También es necesario poder hacer recuentos selectivos de

bacterias lácticas, porque ellas serían, en los medios naturales que nos interesan, los organismos que competirían más directamente con las levaduras.

Para elegir un medio selectivo para levaduras, se comparó previamente el cultivo de *C. kefir* NCYC 744 y de *K. marxianus* NCYC 151 en tres medios diferentes. Dos de ellos, el Agar Extracto de Malta con Oxitetraciclina (OMEA) y el agar Rosa-Bengala Cloranfenicol (RBC) están recomendados para el aislamiento selectivo de levaduras y mohos a partir de cultivos asociados con bacterias (Seiler, 1985; Fleet y Mian, 1987; Suriyarachchi y Fleet, 1981), mientras que el Agar para Levaduras y Mohos (YM), se emplea para la enumeración de estos microorganismos en cultivos puros (Wickerham, 1951). Este último medio se utilizó pues como método de referencia. Tal y como se muestra en la Tabla 20, no se apreciaron diferencias significativas en los recuentos obtenidos en los tres medios de cultivo para sendas cepas, tras la incubación de las placas a 30°C durante 2 días.

Tabla 20. Comparación de los recuentos (ufc/mL) proporcionados por inóculos iguales de *Candida kefir* NCYC 744 o *Kluyveromyces marxianus* NCYC 151, tras su cultivo en distintos medios para levaduras.

	YM	OMEA	RBC
<i>C. kefir</i> NCYC 744	$9,7 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$	1×10^8
<i>K. marxianus</i> NCYC 151	$3,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$

Dado que las levaduras se iban a cultivar en suero de quesería, quisimos comprobar si los dos medios selectivos usados (OMEA y RBC) eran capaces de impedir o limitar el crecimiento de las bacterias lácticas de dos cultivos iniciadores, habitualmente empleados en la elaboración de quesos españoles. Uno de ellos, el “Hansen 0 R-703” está constituido

por especies del género *Lactococcus*, mientras que el “Hansen LD CHN-22” incluye especies de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Como puede verse en la Tabla 21, ninguno de los dos inóculos bacterianos probados, fue capaz de formar colonias en los medios para levaduras, en nuestras condiciones.

Tabla 21. Crecimiento de levaduras y bacterias lácticas en distintos medios para recuentos selectivos de ambos organismos en cultivos asociados¹.

	OMEA	RBC	MRS	MRS-S (0,06%)	MRS-S (0,1%)	LaS
LEVADURAS						
<i>C. kefir</i> NCYC 744	+	+	+	+	+	-
<i>K. marxianus</i> NCYC 151	+	+	+	+	+	-
BACTERIAS LÁCTICAS						
Cultivo iniciador “O R-703”	-	-	+	+	+	-
Cultivo iniciador “LD CHN-22”	-	-	+	+	+	(+)

¹ +: crecimiento positivo; -: crecimiento negativo; (+): crecimiento en forma de microcolonias.

En la Tabla 21 también se recogen los datos sobre la capacidad de las levaduras para crecer en algunos medios de cultivo recomendados para la enumeración selectiva o electiva de bacterias lácticas (Reuter, 1985). Los medios utilizados fueron: el “Man-Rogosa-Sharpe” sin suplementar (MRS) (medio electivo para bacterias lácticas) y suplementado con ácido sórbico al 0,06 y al 0,1% (MRS-S) (selectivo para *Lactobacillus*, *Lactococcus* mesófilos y *Leuconostoc*), así como el agar ácido sórbico (LaS) (selectivo para *Lactobacillus*). Salvo en agar LaS, las dos cepas de levadura crecieron en todos los medios probados, tras 48 horas de incubación a 30°C (Tabla 21). Cuando el tiempo de incubación

de las placas se redujo a 24 horas, de nuevo se observó la formación de colonias en todos los medios con excepción del agar LaS (datos no mostrados). Desafortunadamente, los cultivos iniciadores no crecieron o lo hicieron sólo en forma de microcolonias en el agar LaS (Tabla 21), incluso cuando la incubación de las placas a 30°C se prolongó hasta las 72 horas (datos no mostrados).

A la vista de estos resultados y dada la dificultad, en estas condiciones, para enumerar de forma selectiva y fiable la flora láctica, optamos por emplear el medio OMEA para la enumeración de levaduras durante su cultivo en suero (en presencia pues de bacterias lácticas) y por realizar en este mismo medio el recuento total de microorganismos en vez de el de bacterias lácticas.

2. 1. 2. Permeabilización y conservación de células para el ensayo de la actividad lactásica

El ONPG (o-nitrofenil- β -galactopiranosido), sustrato análogo a la lactosa que se emplea en la valoración de la actividad lactásica, atraviesa con dificultad la membrana plasmática de las levaduras, por la baja afinidad con que es reconocido por la permeasa responsable del transporte de la lactosa (Dickson y Markin, 1980; Flores y col., 1994). Este fenómeno condiciona la determinación de la actividad lactásica, por estar limitada la incorporación del sustrato al medio intracelular, donde se encuentra la β -galactosidasa. Por este motivo, antes de ensayar esta actividad es frecuente someter a las células a tratamientos físicos o químicos a fin de extraer la enzima, o de modificar la permeabilidad de la membrana al ONPG.

Por otra parte, la estructura de las envolturas celulares (membrana y pared) varía con la edad (Serrano y col., 1973; Zomer y col., 1987). Varía sobre todo, la composición de la pared celular, aunque las modificaciones son diferentes de unas especies a otras (Zomer y col., 1987; Fleet, 1991). La susceptibilidad de diferentes especies a los tratamientos hidrolíticos para alterar la pared, es mayor cuando las células son jóvenes (Zomer y col., 1987; Henschke y Rose, 1991). A pesar de ello, varios estudios sobre la producción de

lactasa de diferentes levaduras crecidas en suero, evidencian que esta enzima se sintetiza activamente durante la fase exponencial y alcanza su máxima producción al comienzo de la fase estacionaria de los cultivos (Davies, 1956; Mahoney y col., 1974; Sonawat y col., 1981; Siso, 1994). Por ello, los estudios sobre permeabilización celular se realizaron sobre células de *K. marxianus* NCYC 151 procedentes de la incubación en permeado a las 16 h de cultivo, tiempo coincidente con el final de la fase exponencial, cuya concentración celular correspondía a unas 10^7 ufc/mL.

El tampón fosfato ha sido uno de los compuestos utilizados con éxito para extraer la β -galactosidasa tanto de levaduras deshidratadas (Wendorf y col., 1971) como de células vivas (Stred'ansky y col., 1993). Sin embargo, los tiempos de incubación empleados para liberar así esta enzima al medio extracelular eran superiores a las 16 h en todos los casos. Quisimos comprobar si este tampón podía emplearse también como agente permeabilizante reduciendo el tiempo de tratamiento. Tras 40 min de incubación de *K. marxianus* NCYC 151 en dicho tampón a 37°C no se registró actividad lactásica (datos no mostrados). La incapacidad del tratamiento con tampón fosfato durante tiempos inferiores a 1 h para permeabilizar células de *Kluyveromyces*, ha sido observada anteriormente por Flores y col. (1994).

Pasamos pues a probar procedimientos de permeabilización a base de solventes orgánicos.

En primer lugar, comprobamos el efecto del tiempo de incubación a 37°C con cloroformo al 2%, sobre la actividad lactásica registrada en una suspensión celular de *K. marxianus* NCYC 151. En la Figura 29 se observa el aumento de la actividad enzimática registrada, hasta los 10 min de incubación. A partir de ahí, la actividad disminuye con el tiempo, no detectándose al cabo de 2 h. Aunque en mucha menor medida, otros autores han observado también descensos en la actividad lactásica registrada en otras cepas, tras la incubación prolongada con cloroformo (Stred'ansky y col., 1993; Flores y col., 1994).

La adición de cloroformo origina casi de forma inmediata la aparición de turbidez y precipitados en las suspensiones celulares. Por eso quisimos comprobar si este tratamiento

provocaba lisis celular. Para ello, determinamos la lactasa en los sobrenadantes procedentes de una suspensión celular de *K. marxianus* NCYC 151 permeabilizada con cloroformo durante 10 min. La actividad extracelular registrada sólo representó un 0,4% de la actividad total (datos no mostrados), lo que indica que la enzima se mantenía mayoritariamente intracelular tras el tratamiento. Es probable pues que los precipitados mencionados se deban a restos de células, muertas antes de añadir el solvente. Para limitar la formación de flóculos durante la permeabilización se incorporó EDTA al solvente. Además es conocido que la actividad lactásica es inhibida por la presencia de calcio (Davies, 1964). Por eso se ha recurrido en ocasiones a la adición de compuestos quelantes como el EDTA. Davies (1956) estimó en 0,1 mM la concentración óptima de EDTA, mientras que Castillo y Moreno (1983) elevan dicha concentración hasta 1 mM. Dado que el estudio colaborativo coordinado por la FIL, para proponer un método de determinación de actividad lactásica extracelular y en el cual nuestro grupo de trabajo participó (Engelen y Randsdorp, 1999), optó por emplear EDTA 50 μ M en las mezclas de reacción, ésta fue también la concentración seleccionada para añadir al cloroformo para la permeabilización.

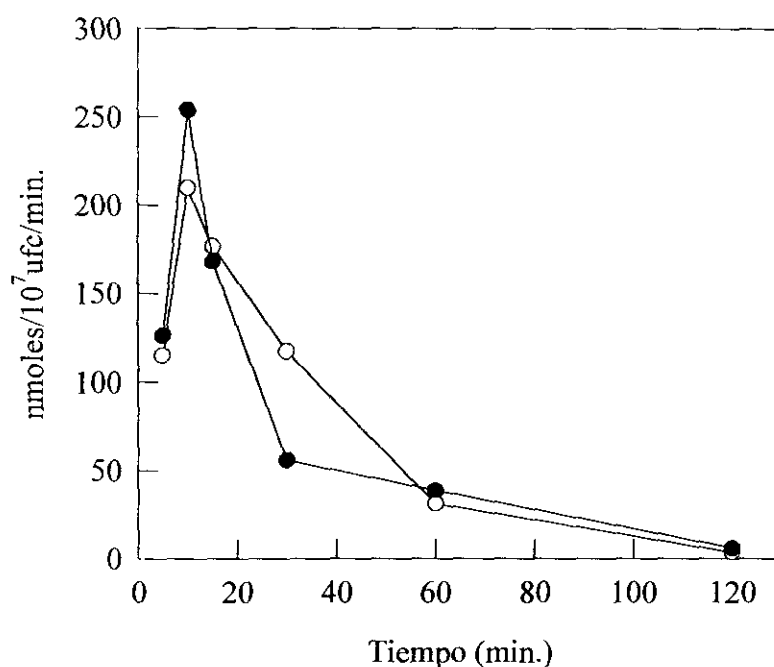


Figura 29. Efecto del tiempo de incubación con cloroformo al 2% (v/v) en ausencia y presencia de EDTA 50 μ M, en la actividad lactásica registrada en una misma suspensión celular de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 151. (Las células procedían de un cultivo de 16 h en permeado a 30°C y 100 rpm y se resuspendieron en tampón fosfato sin EDTA (●) y con EDTA 50 μ M (○)).

La presencia de EDTA durante la permeabilización sin embargo, redujo en un 17% la actividad registrada (Figura 29), por lo que decidimos descartarlo de las mezclas permeabilizantes.

Cuando se empleó tolueno para la permeabilización, se observó que los valores máximos de actividad se alcanzaban tras 40 min de incubación, y que permanecían estables durante otros 20 min (Figura 30). Al prolongar el tiempo de incubación hasta las 2 h, la actividad registrada descendió en sólo un 20%. Así, el tiempo de permeabilización seleccionado fue de 40 min, contando con que la estabilidad de la enzima podría variar entre cepas. Condiciones similares de incubación con tolueno han sido anteriormente empleadas por Barbosa y col. (1985).

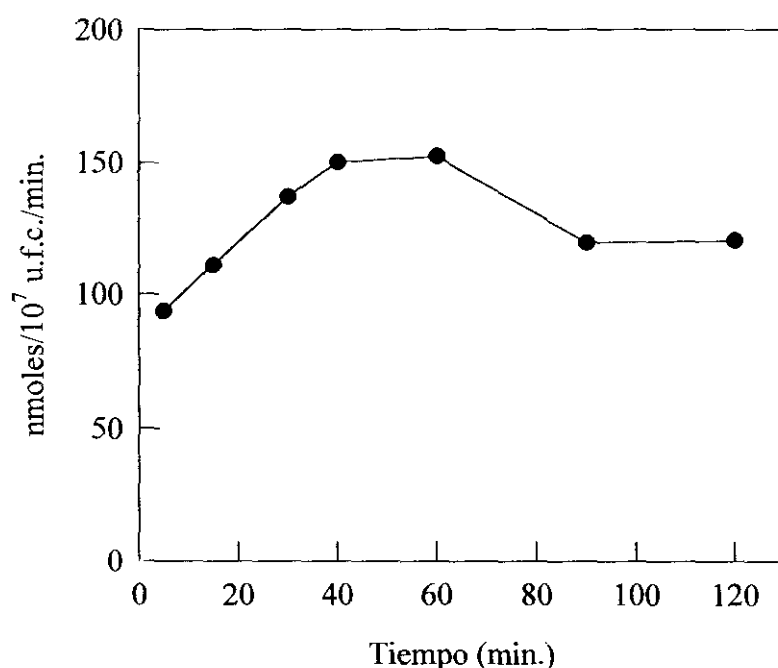


Figura 30. Efecto del tiempo de incubación con tolueno al 2% (v/v) en la actividad lactásica registrada en una suspensión celular de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 151. (Las células procedían de un cultivo de 16 h en permeado a 30°C y 100 rpm y se resuspendieron en tampón fosfato).

A diferencia del cloroformo, la adición de tolueno no indujo turbidez ni modificó la apariencia de las suspensiones celulares. No obstante, quisimos asegurarnos que tras el tratamiento con este solvente la β -galactosidasa no se liberaba al medio extracelular. Sólo un 0,5% de la actividad lactásica total resultó estar presente en el medio extracelular (datos no mostrados), siendo este porcentaje de liberación similar al descrito para otras cepas por Flores y col. (1994).

La ausencia de precipitación en las mezclas de permeabilización, junto con la mayor estabilidad de la actividad lactásica en presencia de tolueno, hicieron que seleccionáramos este solvente como agente permeabilizante.

Dado el gran número de muestras a ensayar y la escasa disponibilidad de tiempo entre toma y toma de muestra, se hacía difícil la determinación inmediata de la actividad lactásica en nuestras experiencias. De ahí que estudiáramos distintas alternativas de conservación de las muestras.

Dickson y Markin (1980) recomendaban que la conservación de células previamente permeabilizadas con tolueno a 4°C no excediese las 5 h. En nuestro caso, estudiamos el efecto sobre la actividad lactásica del tiempo de conservación de las células sin permeabilizar procedentes de una misma suspensión celular de *C. kefir* NCYC 143 en tampón fosfato, a dos temperaturas (-20 y 4°C). Dado que la permeabilidad de las membranas de las levaduras puede variar con la edad (Flores y col., 1994), este estudio se realizó con células de fase exponencial y fase estacionaria. En la Tabla 22 se observa que en las células jóvenes (en fase exponencial), la actividad lactásica aumenta con el tiempo de conservación, siendo un 24% más elevada que la inicial después de 30 h a 4°C. Este incremento de la actividad lactásica podría atribuirse a diversos factores. Por una parte, el tampón fosfato en el que se encuentran las células podría haber alterado la membrana celular, favoreciendo un mayor grado de permeabilización. Por otro lado, podría haber aumentado un poco el número de células, a pesar de que la temperatura mínima de crecimiento de esta cepa está en torno a los 10°C (Boud, 1993). La actividad lactásica de las células en fase estacionaria disminuyó sin embargo con el tiempo de conservación a

4°C, siendo hasta un 38% inferior que la del correspondiente control, lo que probablemente se deba a una inactivación parcial de la enzima. La gran variabilidad observada en los valores de la actividad lactásica en función de la edad del cultivo, nos hicieron desestimar este método de conservación.

Tabla 22. Actividad lactásica de suspensiones celulares de *Candida kefir* NCYC 143 en tampón fosfato en distintas fases de crecimiento (18 y 43 h), tras su conservación a 4°C.

Almacenamiento	Fase de crecimiento			
	18 h		43 h	
	Actividad lactásica		Actividad lactásica	
(horas)	(nmoles/min.)	%	(nmoles/min.)	%
0	295	100	1.776	100
19	335	113	1.448	81
24	362	122	1.112	62
30	366	124	1.496	84
48	348	117	1.875	105

Cuando las células se mantuvieron congeladas durante 72 h (Tabla 23), se observó un descenso de la actividad lactásica de un 10 y un 20 %, respectivamente, en las preparaciones procedentes de la fase exponencial y estacionaria. Esta disminución de la actividad podría deberse a una inactivación parcial de la enzima, o a una modificación de la membrana, que se traduciría en una menor accesibilidad del sustrato al interior de la célula.

No obstante, y dado el menor efecto que la congelación tuvo sobre la actividad lactásica, decidimos utilizar este sistema de conservación durante un tiempo no superior a las 72 h.

Tabla 23. Actividad lactásica de suspensiones celulares de *Candida kefir* NCYC 143 en tampón fosfato en distintas fases de crecimiento (18 y 43 h), tras su conservación a -20°C.

Almacenamiento (horas)	Fase de crecimiento			
	18 h		43 h	
	Actividad lactásica		Actividad lactásica	
	(nmoles/min.)	%	(nmoles/min.)	%
0	825	100	2.886	100
24	801	97	2.563	88
48	726	88	2.487	86
72	774	93	2.343	81

2. 2. Estudio básico de las levaduras y aguas residuales

2. 2. 1. *Cepas procedentes de las colecciones británica y española*

Las cepas procedentes de la colección británica pertenecientes a los géneros *Kluyveromyces* y *Candida* y las cepas de la colección española del género *Debaryomyces*, fueron cultivadas en permeado para conocer algunos aspectos de su comportamiento en este medio, como crecimiento, capacidad de utilizar la lactosa y de formar flóculos. El objetivo de este estudio, tanto de las cepas de colección como de las aisladas (que se describen en el siguiente apartado), fue seleccionar aquellas que mostraran una mejor aptitud para rebajar la concentración de lactosa del permeado y para flocular, ya que esta última característica podría suponer un ahorro importante para la recuperación de células.

Los criterios para seleccionar cepas del catálogo de la colección británica (Boud, 1993), fueron en primer lugar, su capacidad para fermentar lactosa y por otra parte, el hecho de estar consideradas, por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos, como GRAS (Generally Recognized As Safe), ya fuera el microorganismo (caso de *Kluyveromyces marxianus*) (Harden, 1996) o sus enzimas (*K. marxianus*, *K. lactis* y *C. kefir*) (FDA, 1984; Wasserman, 1984). Esto abriría las puertas para su empleo en alimentos para consumo humano, respetándose las Buenas Prácticas de Fabricación.

2. 2. 1. 1. Velocidad de crecimiento y consumo de lactosa

Cuando se inoculó el permeado con 10^4 ufc/mL de cada cepa, todas las tomadas de la colección británica alcanzaron las 10^8 ufc/mL después de 20 h de cultivo (datos no mostrados). Los tiempos de duplicación celular mostraron una variación moderada, no observándose diferencias marcadas en cuanto a adaptación al medio entre los dos géneros estudiados (Tabla 24). Las cepas que mostraron mayor velocidad de crecimiento fueron las NCYC 851 y 143.

Tabla 24. Tiempos de duplicación celular (min) de las levaduras seleccionadas de la colección británica, cultivadas en permeado a 30°C.

Cepa	Min.
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 151	92
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587	76
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 851	70
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1429	97
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> NCYC 1368	90
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> NCYC 1548	84
<i>Candida kefir</i> NCYC 143	71
<i>Candida kefir</i> NCYC 744	98

Al comparar nuestros resultados con los de otros autores, es preciso recordar que la mayor parte de los estudios publicados se han realizado utilizando permeados enriquecidos con suplementos nutritivos. También hay que tener en cuenta que el valor nutritivo de los permeados, sobre todo en cuanto a material nitrogenado, depende de las enzimas, la flora y las condiciones de fermentación en la quesería, así como del tamaño de poro de las membranas de ultrafiltración, que retengan más o menos péptidos. Castillo y De Sánchez (1978) y Barbosa y col. (1985) han determinado los tiempos de duplicación celular de distintas cepas de *K. marxianus*, entre ellas de la NCYC 587 empleada en este trabajo, en suero desproteinizado por acidificación y calentamiento, suplementado con sulfato amónico y extracto de levadura. Estos tiempos oscilaban entre 56 y 154 min, comparables pues con los obtenidos aquí para la misma especie (70-97 min). También El-Samragy y Zall (1988) registraron tasas de crecimiento aceptables en cultivos de distintas especies de *Kluyveromyces* y *Candida* en permeados de ultrafiltración tratados térmicamente pero sin suplementar. Esto parece sugerir que al menos este tipo de permeado de ultrafiltración no es un medio muy limitante para el crecimiento de este tipo de levaduras. En otra parte del trabajo presentamos nuestros datos sobre los efectos de la suplementación.

Hasta donde nosotros conocemos, no se han publicado datos sobre tiempos de duplicación celular de formas imperfectas de *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*) cultivadas en algún tipo de permeado. Bayer (1983) sin embargo, ha estimado en 138 min el correspondiente a *Candida intermedia* en suero desproteinizado y enriquecido con distintos suplementos.

Atendiendo al grado de utilización de la lactosa del permeado tras 43 h de cultivo, podemos agrupar las cepas de la colección británica en 3 grupos: poco, moderadas y muy rápidamente utilizadoras de este azúcar (Tabla 25). Dentro del grupo de las poco utilizadoras, se encuentran *K. marxianus* NCYC 851 y *K. marxianus* NCYC 587. El segundo grupo, constituido por levaduras que utilizan este disacárido a velocidad moderada, incluye a *K. lactis* var. *lactis* NCYC 1548 y *K. lactis* var. *lactis* NCYC 1368, las cuáles disminuyeron en 43 h la concentración de lactosa en el permeado en un 76 y un 61 %, respectivamente (Tabla 25). Por último, las muy activamente utilizadoras de lactosa son

las cepas *K. marxianus* NCYC 151, *K. marxianus* NCYC 1429, *C. kefir* NCYC 143 y *C. kefir* NCYC 744 (Tabla 25). Dentro de este último grupo destacaron por su velocidad de degradación las levaduras pertenecientes a la especie *C. kefir*, que consumieron alrededor de la mitad de la lactosa inicial en sólo 22 h de cultivo.

Tabla 25. Desarrollo del consumo de lactosa en los cultivos en permeado inoculados con cepas de la colección británica.

CEPA	DESAPARICIÓN DE LACTOSA (%)		
	18 h	22 h	43 h
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 151	0	16	100
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587	0	0	6
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 851	11	12	23
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1429	9	26	100
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> NCYC 1368	10	10	61
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i> NCYC 1548	8	14	76
<i>Candida kefir</i> NCYC 143	8	46	100
<i>Candida kefir</i> NCYC 744	17	35	100

También para comparar velocidades de agotamiento de lactosa, hay que referirse a lo publicado sobre cultivos de levaduras en sueros desproteinizados, enriquecidos con distintos tipos de suplementos, sobre todo nitrogenados. Castillo y De Sánchez (1978) por ejemplo observaron que la cepa NCYC 587 era capaz de consumir un 30 % más del nivel de lactosa inicial, a las 48 h de cultivo, al enriquecer el suero desproteinizado con sulfato amónico y extracto de levadura. Sin embargo, con otras cepas no se ha observado que la adición de sulfato amónico al suero desproteinizado sea capaz de modificar significativamente la velocidad de utilización del disacárido; así parece ocurrir por ejemplo

con otra de las cepas empleadas en nuestro estudio, la *C. kefir* NCYC 744 (Bales y Castillo, 1979). Varios grupos de trabajo han sugerido que el consumo de lactosa se favorece cuando se adiciona fósforo al suero desproteinizado (Wasserman y col., 1958; Harju y col., 1976). El empleo de este suplemento, sin embargo, parece dar distintos resultados en función del tipo de permeado o suero y también de las cepas de levadura empleadas. Así por ejemplo, la adición de fósforo en concentraciones comprendidas entre el 0,3 y el 0,5 % no resultó mejorar significativamente la velocidad de utilización de la lactosa en cultivos de *Kluyveromyces marxianus* (Wendorf y col., 1970; Castillo y De Sánchez, 1978) ni de *Candida kefir* (Bales y Castillo, 1979).

Aunque no existen muchos datos disponibles sobre este particular, El-Samragy y Zall (1988) han observado, al cultivar distintas especies de *Kluyveromyces* y *Candida* en permeado sin suplementar, que la desaparición de lactosa tras 72 h de cultivo puede oscilar entre el 37 y el 100 %, habiéndose alcanzado un nivel de crecimiento de entre 10^8 – 10^9 ufc/mL.

A pesar de que es posible que algunas de las cepas de la colección británica probadas por nosotros mostraran un comportamiento diferente en presencia de distintos suplementos, pre-seleccionamos aquellas pertenecientes a los grupos de moderadamente y muy activamente utilizadoras de lactosa para estudios posteriores.

De la colección española se seleccionaron 3 cepas de *Debaryomyces polymorphus* var. *polymorphus* CECT 10060, *Deb. polymorphus* var. *polymorphus* CECT 10099 y *Deb. hansenii* CECT 10360, aisladas respectivamente de suelo, leche condensada y queso, y caracterizadas por asimilar, pero no fermentar, la lactosa (Kreger van Rij, 1984b). *Deb. hansenii* parece ser un contaminante habitual de las instalaciones queseras que en numerosas ocasiones ha sido aislada de estos hábitats (Fleet y Mian, 1987; Fleet, 1990; Rohm y col., 1992; Viljoen y Greyling, 1995; Westall y Filtenborg, 1998a y 1998b), por lo que de las especies citadas, es presumiblemente la mejor adaptada a medios ricos en lactosa.

Las cepas de *Debaryomyces* mostraron un crecimiento mucho más lento que las de *Candida* y *Kluyveromyces* de la colección británica, tardando en alcanzar niveles similares (10^8 ufc/mL) en un tiempo 48-72 h superior (datos no mostrados).

También en cuanto a velocidad de consumo de lactosa, las cepas de *Debaryomyces* mostraron un comportamiento mucho más lento, utilizando tan sólo un 20% de la concentración inicial al final de cultivos de análoga duración (Tabla 26).

Tabla 26. Desarrollo del consumo de lactosa en los cultivos en permeado inoculados con cepas de la colección española.

CEPA	DESAPARICIÓN DE LACTOSA (%)		
	10 h	24 h	48 h
<i>Debaryomyces polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i> CECT 10060	5	10	16
<i>Debaryomyces polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i> CECT 10099	5	7	18
<i>Debaryomyces hansenii</i> CECT 10360	0	17	20

A diferencia de los géneros anteriormente descritos, no existen estudios previos sobre el comportamiento de *Debaryomyces* en distintos tipos de suero y permeado de quesería. No obstante, la ineficacia para consumir la lactosa mostrada por *Deb. polymorphus* en nuestras condiciones, esto es, en cultivos en matraz en los que el oxígeno puede llegar a ser limitante (Kato y Tanaka, 1998; Kiers y col., 1998), podría ser atribuible al denominado efecto Kluyver (Barnett y Sims, 1982; Schulz y Höfer, 1986; Barnett, 1992). Este efecto se traduce en la incapacidad de transportar lactosa a través del sistema protón-simpor-te, como consecuencia de la disminución del contenido de ATP intracelular, característica del crecimiento anaeróbico (Schulz y Höfer, 1986). *Deb. hansenii*, sin embargo, es una especie aerobia estricta de la que se ha descrito que bajo condiciones limitantes de oxígeno prácticamente no utiliza la lactosa (Gancedo y Serrano, 1989). Así pues, cabe la posibilidad de que el pobre comportamiento en cuanto a velocidad de consumo de lactosa

que hemos registrado para estas *Debaryomyces* pudiera mejorar forzando la aireación. Esto, como el empleo de suplementos, puede encarecer considerablemente un proceso para el que se desea economizar costes al máximo posible.

2. 2. 1. 2. Floculación de las cepas de colección

Con objeto de abaratar el proceso de producción (concretamente la fase de separación) de las levaduras, se hizo un pequeño estudio de la aptitud floculante de las cepas de colección, así como de la influencia en ella de algunos aspectos de composición del medio.

En primer lugar, comprobamos la capacidad de floculación de las cepas de colección en el permeado de ultrafiltración tras alcanzar la fase estacionaria, es decir, cuando la lactosa ya había sido mayoritariamente utilizada tras 72 h de cultivo. Como se observa en las Tablas 27 y 28 ninguna cepa de los tres géneros empleados (*Kluyveromyces*, *Candida* y *Debaromyces*) mostró una capacidad de floculación elevada.

Tabla 27. Medida de la floculación en tubos de cepas procedentes de la Colección Nacional Británica cultivadas en permeado y en medio YPD¹.

Cepa	Permeado	Medio YPD
NCYC 151	0	1
NCYC 587	1	1
NCYC 851	0	0
NCYC 1429	0	0
NCYC 1368	1	0
NCYC 1548	0	1
NCYC 143	1	1
NCYC 744	0	0

¹ Los resultados se contabilizan de la siguiente manera: 0: no floculante; 1: ligeramente floculante; 2: floculante; 3: bastante floculante y 4: extremadamente floculante

Tabla 28. Medida de la floculación en tubos de cepas procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo cultivados en permeado y en medio YPD ¹.

Cepa	Permeado	Medio YPD
CECT 10060	2	1
CECT 10099	1	0
CECT 10360	0	2

¹ Los resultados se contabilizan de la siguiente manera: 0: no floculante; 1: ligeramente floculante; 2: floculante; 3: bastante floculante y 4: extremadamente floculante

Diversos autores han descrito que la presencia de lactosa en el medio puede provocar un ligero efecto inhibitorio de la floculación, tanto en especies incapaces de utilizar la lactosa como sustrato (*Saccharomyces ludwigii*; Stratford y Pearson, 1992), como en las que sí la utilizan (*K. bulgaricus* o *K. lactis*; Hussain y col., 1986; Bellal y col., 1995). La galactosa, aunque se encuentra en muy pequeña concentración (1,2 mM) en el permeado, podría quizás también contribuir a originar una merma en la capacidad de floculación. Se ha descrito una inhibición de la floculación por adición de D-galactosa 15 y 111 mM en los géneros *Candida* y *Kluyveromyces* (Hussain y col., 1986; Al-Mahmood y col., 1988; Bellal y col., 1995). El mecanismo por el cual la D-galactosa inhibe la formación de flóculos no se conoce adecuadamente. En un principio se postuló que este monosacárido actuaba como un impedimento estérico, saturando las lectinas, que reconocen a los polisacáridos específicos de la pared, de tipo galactomanano. Sin embargo, al no haberse encontrado galactopolisacáridos (Hussain y col., 1986) en la pared celular de *Kluyveromyces*, Al-Mahmood y col. (1988) sugirieron una nueva teoría, según la cual la D-galactosa induciría la síntesis de proteasas endógenas, que desprenderían a las lectinas de la pared, con la consiguiente incapacitación para la floculación.

Otro factor determinante de la floculación es la concentración de calcio, que se cree actúa estabilizando la conformación de las lectinas y favoreciendo así su asociación con los polisacáridos (Miki y col., 1982a). Para algunos autores (Hussain y col. 1986) la concentración mínima de calcio requerida para inducir la floculación en *Kluyveromyces* es

menor a la presente en el permeado de suero (10 mM Ca^{2+} ; Zadow, 1992). Otros autores, sin embargo, registran buenos niveles de floculación elevando la concentración de calcio hasta 70 mM (Fernandes y col., 1993).

Bellal y col. (1995) encontraron por otra parte, que los porcentajes de floculación aumentaban al cultivar *K. lactis* en medios ricos en glucosa y peptona. Por este motivo, decidimos comprobar la capacidad de floculación de nuestras cepas en el medio YPD, abundante en los compuestos citados, y que ha sido utilizado por diversos autores para estudiar la floculación de levaduras (Miki y col., 1982a; Watari y col., 1991; Stratford y Pearson, 1992; Cubells y col., 1996).

Como puede verse en la Tabla 27, el uso de medio YPD no supuso una mejora en la capacidad de floculación de las cepas procedentes de la colección británica, pero sí mejoró ligeramente la de *Deb. hansenii* CECT 10360 (Tabla 28). Este aumento podría deberse a la peptona, descrita como estimulante de la floculación de su forma imperfecta *C. famata* (Cubells y col., 1996).

A la vista de los resultados referentes al consumo de lactosa y la capacidad de floculación, decidimos seleccionar las cepas de la colección británica NCYC 151, NCYC 1429, NCYC 1548, NCYC 1368, NCYC 744 y NCYC 143, para su posterior estudio en otros aspectos.

2. 2. 2. Cepas procedentes de las aguas residuales de quesería

2. 2. 2. 1. Obtención y selección de cepas de aguas residuales. Consumo de lactosa

Las cepas aisladas de los efluentes lácteos, tal y como se describe en el apartado 10 de Material y Métodos, se cultivaron en permeado para seleccionar las que mostrasen una mejor capacidad para utilizar la lactosa. Las cepas aisladas directamente de los efluentes se denominaron con la letra D y las que tenían el mismo origen pero fueron adaptadas al crecimiento en lactosa por pases en permeado, con la A.

Como se observa en la Tabla 29, aproximadamente la mitad de las cepas obtenidas a partir del agua residual de la quesería pequeña alcanzaron niveles de 10^8 ufc/mL en 72 h de incubación en permeado, con independencia de que fueran cepas D o A. Las distintas tasas de crecimiento en ellas registradas (Tabla 29) pueden atribuirse a diferentes requerimientos nutritivos, satisfechos en distinta proporción por la composición del permeado (Wasserman y col., 1958; Wendorf y col., 1970; Harju y col., 1976).

Dado que las cepas A se habían adaptado ya al crecimiento en permeado, era de esperar que mostrasen en general mejor aptitud para el consumo de lactosa. Entre este grupo de cepas destacaron la AT-7 y la AT-10, capaces de consumir toda la lactosa presente tras 40 h de cultivo. Hay que resaltar en particular el comportamiento mostrado por la cepa AT-7, que utilizó el 99% de la lactosa en tan solo 24 h de incubación (Tabla 29). En conjunto, la mayor parte de las cepas, tanto D como A, consumieron poca lactosa, incluso tras haber alcanzado la fase estacionaria y altos niveles de población a las 72 h (Tabla 29). Similares resultados han sido descritos por El-Samragy y Zall (1988) tras cultivar cepas de levadura de diversos géneros en permeado sin suplementar.

A la vista de los resultados, de las 26 cepas aisladas de la quesería pequeña, se seleccionaron la AT-7 y la AT-10 para estudios posteriores.

Por lo que se refiere al efluente de la quesería mediana, sólo proporcionó dos cepas del tipo D. Las del tipo A no mostraron mejor aptitud para crecer en permeado que las D (Tabla 30). En general, todas las cepas consumieron poca lactosa, excepto la DJ-14 que fue capaz de utilizar la mitad de la lactosa inicial a las 72 h (Tabla 30). Descartamos pues las posibilidades de empleo de las levaduras obtenidas de esta quesería.

Tabla 29. Desarrollo del consumo de lactosa (%) y recuentos a las 72 h en los cultivos en permeado inoculados con cepas procedentes del efluente de la quesería Pequeña.

CEPA	DESAPARICIÓN DE LACTOSA (%)			RECuentos ¹ (ufc/mL)
	24 h	40 h	72 h	
DT 2	2	16	34	$1,8 \times 10^8$
DT 13	0	17	31	$4,1 \times 10^7$
DT 22	0	8	24	$6,4 \times 10^7$
DT 25	0	0	16	$3,1 \times 10^7$
DT 27	9	32	52	2×10^8
DT 31	0	10	18	$3,6 \times 10^7$
DT 33	5	15	32	$2,4 \times 10^8$
AT 1	0	24	27	$1,3 \times 10^8$
AT 3	0	18	30	$8,4 \times 10^7$
AT 4	2	2	11	$1,9 \times 10^6$
AT 5	0	20	22	$1,1 \times 10^9$
AT 6	0	0	13	$2,4 \times 10^6$
AT 7	99	100	100	$1,7 \times 10^8$
AT 9	0	12	14	$7,7 \times 10^8$
AT 10	63	100	100	$1,1 \times 10^8$
AT 11	0	27	30	$1,5 \times 10^9$
AT 12	0	11	18	$1,1 \times 10^6$
AT 13	2	16	30	$9,5 \times 10^6$
AT 14	0	10	18	$5,8 \times 10^5$
AT 15	0	18	19	$7,1 \times 10^6$
AT 16	0	10	15	$1,1 \times 10^8$
AT 17	0	18	26	9×10^6
AT 19	0	17	18	2×10^8
AT 21	0	10	17	$8,1 \times 10^6$
AT 22	0	18	94	$9,6 \times 10^7$
AT 24	0	2	18	$1,1 \times 10^6$

¹El inóculo de partida fue de 10^5 ufc/mL en todos los casos.

Tabla 30. Desarrollo del consumo de lactosa (%) y recuentos a las 72 h en los cultivos en permeado inoculados con cepas procedentes del efluente de la quesería Mediana.

CEPA	DESAPARICIÓN DE LACTOSA (%)			RECuentos ¹ (ufc/mL)
	24 h	40 h	72 h	
DJ 1	11	23	33	4,3 x 10 ⁸
DJ 14	0	13	52	4,4 x 10 ⁸
AJ 1	0	23	24	7,2 x 10 ⁶
AJ 7	0	10	10	5,5 x 10 ⁸
AJ 10	0	12	14	6,6 x 10 ⁶
AJ 11	0	18	18	2,6 x 10 ⁶
AJ 13	0	18	21	3,1 x 10 ⁸
AJ 14	0	14	14	2,2 x 10 ⁷
AJ 15	0	17	26	2,8 x 10 ⁷
AJ 16	0	15	15	1,1 x 10 ⁷
AJ 17	8	8	18	1,6 x 10 ⁶

¹El inóculo de partida fue de 10⁵ ufc/mL en todos los casos.

De manera similar a lo observado en las cepas de las dos queserías descritas, en las procedentes de la quesería grande, no siempre se constató una correlación positiva entre el nivel de crecimiento y la capacidad para utilizar la lactosa como sustrato (Tabla 31). En este caso, y a diferencia de lo observado en las cepas de la quesería pequeña, la adaptación previa al medio de cultivo no sirvió para seleccionar cepas que consumieran el disacárido más rápidamente. Por el contrario, las cepas que mostraron un consumo más alto fueron la DF-5 y la DF-27. Entre las adaptadas, tan solo la cepa AF-9, mostró una buena aptitud para el consumo de la lactosa. El agua residual empleada para obtener ambos tipos de cepas (D y A), procedía de la balsa de homogeneización adscrita al sistema de depuración que tiene instalado dicha industria. Es posible que en ella se produzca cierto grado de adaptación de las levaduras para el aprovechamiento de lactosa, lo que explicaría un mejor comportamiento en este sentido, entre las cepas de tipo D. De esta quesería se seleccionaron las cepas DF-5, DF-27 y AF-9 para su posterior estudio e identificación.

Tabla 31. Desarrollo del consumo de lactosa (%) y recuentos a las 72 h en los cultivos en permeado inoculados con cepas procedentes del efluente de la quesería Grande.

CEPA	DESAPARICIÓN DE LACTOSA (%)			RECuentos ¹ (ufc/mL)
	24 h	40 h	72 h	
DF 5	37	91	100	6×10^8
DF 13	10	15	15	$3,9 \times 10^7$
DF 22	0	13	19	$1,6 \times 10^6$
DF 27	42	100	100	$8,2 \times 10^7$
AF 1	0	0	14	$2,3 \times 10^7$
AF 2	0	11	11	$3,6 \times 10^6$
AF 3	0	3	12	$1,3 \times 10^8$
AF 4	0	9	12	$3,1 \times 10^6$
AF 6	0	8	22	$1,5 \times 10^6$
AF 9	42	88	99	$1,8 \times 10^8$
AF 11	0	26	60	$2,7 \times 10^7$
AF 12	0	18	18	$1,8 \times 10^7$
AF 13	0	18	35	$1,4 \times 10^9$
AF 19	0	2	11	6×10^8
AF 22	0	17	17	$1,6 \times 10^7$
AF 23	0	5	10	$4,1 \times 10^6$
AF 24	0	3	5	3×10^7
AF 27	0	3	16	$3,6 \times 10^7$
AF 28	0	8	14	$2,8 \times 10^7$
AF 29	0	11	77	$1,9 \times 10^8$
AF 30	0	21	21	$2,2 \times 10^6$
AF 31	0	3	34	$6,3 \times 10^7$

¹El inóculo de partida fue de 10^5 ufc/mL en todos los casos.

2. 2. 2. 2. Floculación de las cepas aisladas de aguas residuales

Al igual que las cepas de las colecciones española y británica, el estudio del grado de floculación de la totalidad de las 59 cepas aisladas reveló que ninguna de éstas poseía buena aptitud floculante tras cultivarse 48 h en permeado (Tabla 32). Las cepas consideradas como buenas utilizadoras de lactosa no fueron capaces de flocular, y las que sí lo hicieron, no mostraron una velocidad adecuada de consumo del azúcar (Tablas 29, 30, 31 y 32). Cuando se analizó la capacidad floculante de cada una de ellas en medio YPD,

tan solo una, la AF-22, más bien pobre utilizadora de lactosa, alcanzó un grado de floculación aceptable (Tabla 32).

Tabla 32. Medida de la floculación en tubos de todas las cepas aisladas de efluentes lácteos cultivadas en permeado y en medio YPD¹.

Cepa ²	Permeado	Medio YPD	Cepa ²	Permeado	Medio YPD
DF 5	0	0	AJ 15	1	0
DF 13	1	0	AJ 16	2	2
DF 22	0	0	AJ 17	0	1
DF 27	0	0	DT 2	0	1
AF 1	2	0	DT 13	1	0
AF 2	0	0	DT 22	0	0
AF 3	0	0	DT 25	2	2
AF 4	0	0	DT 27	1	2
AF 6	0	0	DT 31	2	0
AF 9	0	0	DT 33	0	0
AF 11	2	0	AT 1	0	0
AF 12	1	0	AT 3	1	1
AF 13	0	0	AT 4	0	0
AF 19	1	0	AT 5	0	0
AF 22	2	3	AT 6	0	0
AF 23	1	1	AT 7	0	1
AF 24	2	1	AT 9	1	0
AF 27	2	1	AT 10	0	0
AF 28	2	2	AT 11	0	0
AF 29	0	0	AT 12	1	0
AF 30	0	0	AT 13	1	0
AF 31	2	0	AT 14	0	0
DJ 1	1	1	AT 15	0	0
DJ 14	1	2	AT 16	0	0
AJ 1	0	2	AT 17	0	0
AJ 7	1	0	AT 19	0	0
AJ 10	1	0	AT 21	0	0
AJ 11	2	2	AT 22	0	0
AJ 13	0	1	AT 24	0	0
AJ 14	1	0			

¹ Los parámetros de resultado se contabilizan de la siguiente manera: 0: no floculante; 1: ligeramente floculante; 2: floculante; 3: bastante floculante y 4: muy floculante.

² Las cepas DF y AF proceden de la quesería grande; las DJ y AJ de la mediana y las DT y AT de la pequeña.

2. 2. 2. 3. Clasificación

Las 5 cepas por nosotros aisladas y seleccionadas por su capacidad de utilizar la lactosa (DF-5, DF-27, AF-9, AT-7 y AT-10), fueron identificadas por la División de Levaduras (Servicio de Identificación) del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) de Holanda. En la clasificación se utilizaron las pruebas de identificación y caracterización morfológica y fisiológica enumeradas en el apartado 10. 3 de Material y Métodos.

En las Tablas 33, 34 y 35 se muestran los resultados obtenidos en las diversas pruebas realizadas a las cinco cepas. Como puede verse, cuatro de las cinco cepas se identificaron como *Kluyveromyces marxianus* (DF-27, AF-9, AT-7 y AT-10) y la quinta como *Candida intermedia* (DF-5) (especie que se caracteriza por no fermentar lactosa, aunque es capaz de asimilarla) (van Uden y Buckley, 1971; Meyer y col., 1984). Es interesante observar que las 5 cepas resultaron ser capaces de utilizar, además de lactosa, celobiosa, otro disacárido con enlace β 1-4 que pocos organismos degradan. Otro aspecto de interés industrial es la capacidad de las 4 *Kluyveromyces* no sólo para fermentar la lactosa, sino también para utilizar el lactato y crecer a 37°C, aptitudes todas ellas de las que carece nuestra *Candida intermedia* (DF-5).

Hasta donde nosotros conocemos, no se han realizado estudios de caracterización de las levaduras presentes en los efluentes lácteos. Sin embargo, existen diversos autores que han aislado e identificado levaduras a partir de instalaciones y productos lácteos como ya se describió en el apartado 5 de la Introducción. En dicho capítulo se puso de manifiesto el papel destacado de *K. marxianus* como levadura deseable y contaminante en los procesos de elaboración de quesos.

Aunque, *Candida intermedia* también ha sido aislada de quesos (Rohm y col., 1992; Westall y Filtenborg, 1998a), sueros (Rohm y col., 1992; Westall y Filtenborg, 1998a), salmueras (Seiler y Busse, 1990; Rohm y col., 1992; Westall y Filtenborg, 1998a) e instalaciones de la industria láctea (Viljoen y Greyling, 1995; Westall y Filtenborg, 1998a), su incidencia es bastante escasa. Aunque sólo hay datos preliminares al respecto, la

presencia de *Candida intermedia* parece relacionada con la aparición de defectos en quesos del tipo Feta (Westall y Filtenborg, 1998a).

Tabla 33. Características morfológicas de las levaduras seleccionadas.

Cepa	DF-5	DF-27	AF-9	AT-7	AT-10
<i>Morfología</i>					
Colonias rosadas	-	-	-	-	-
Células con forma de limón	-	-	-	-	-
Filamentos	+	+	+	+	+
Artroconidias	-	-	-	-	-
Ascosporas	-	+, (1)	+, (1)	+, (1)	+, (1)
Gemación	+	+	+	+	+
Gemas en los talos	-	-	-	-	-
Pseudohifas	+	+	+	+	+
Balistoconidias	-	-	-	-	-
Fisión	-	-	-	-	-
Hifas septadas	-	-	-	-	-
Balistoconidias simétricas	-	-	-	-	-

(1) oval-reniforme

Tabla 34. Características fisiológicas de las levaduras seleccionadas.

Cepa	DF-5	DF-27	AF-9	AT-7	AT-10
<i>Asimilación de compuestos carbonados</i>					
D-Glucosa	+	+	+	+	+
D-Galactosa	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	+	-	-	-	-
D-Glucosamina	+	-	-	-	-
D-Ribosa	-	-	-	-	-
D-Xilosa	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	-	+	+	+	+
D-Arabinosa	-	-	-	-	-
L-Ramnosa	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	-	-	-	-
α,α -Trealosa	+	-	-	-	-
metil α -D-glucósido	+	-	-	-	-
Celobiosa	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+
Melobiosa	-	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+
Melecitosa	+	-	-	-	-
Inulina	-	+	+	+	+
Almidón soluble	+	-	-	-	-

Tabla 34. (continuación).

Cepa	DF-5	DF-27	AF-9	AT-7	AT-10
<i>Asimilación de compuestos carbonados</i>					
Glicerol	-	-	+	+	+
<i>meso</i> -Eritritol	-	-	-	-	-
Ribitol	+	-	+	+	+
Xilitol	+	+	+	+	+
<i>L</i> -Arabinitol	-	-	-	-	-
D-Glucitol	+	+	+	+	+
D-Manitol	+	-	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-
<i>mio</i> -Inositol	-	-	-	-	-
Glucono δ -lactona	+	-	-	-	-
2-Keto-D-gluconato	nd	nd	nd	nd	nd
D-Gluconato	+	-	-	-	-
D-Glucuronato	-	-	-	-	-
D-Galacturonato	-	-	-	-	-
DL-Lactato	-	+	+	+	+
Succinato	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	-	+	+
Metanol	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+
Propano 1,2 diol	+	-	-	-	-
Butano 2,3 diol	-	+	+	+	+
Acido quínico	+	-	-	-	-
Sacarato	-	-	-	-	-

(nd): no determinado.

Tabla 34. (continuación).

Cepa	DF-5	DF-27	AF-9	AT-7	AT-10
<i>Asimilación de compuestos nitrogenados</i>					
Nitrato	-	-	-	-	-
Cadaverina	+	+	+	+	+
Etilamina	+	+	+	+	+
L-Lisina	+	+	+	+	+
<i>Producción</i>					
Acido acético	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-
<i>Crecimiento</i>					
A 37°C	-	+	+	+	+

Tabla 35. Fermentación de azúcares de las levaduras seleccionadas.

Cepa	DF-5	DF-27	AF-9	AT-7	AT-10
<i>Fermentación</i>					
D-Glucosa	+	+	+	+	+
D-Galactosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+

2. 2. 3. Características de las aguas residuales de las tres queserías

Para aislar cepas de levaduras de efluentes de quesería, se seleccionaron 3 plantas de muy distinto tamaño, especialidad y tipo de instalación. En las mismas muestras de efluente que sirvieron para el aislamiento de cepas se analizaron las principales características físico-químicas y microbiológicas (Tabla 36).

Tabla 36. Características físico-químicas y microbiológicas de las aguas residuales producidas por las tres industrias queseras colaboradoras.

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	PEQUEÑA	MEDIANA	GRANDE
Volumen procesado (L/día)	3.000	60.000	700.000
pH	6,5	10,0	5,9
Sólidos Totales (g/L)	71,6	4,4	8,2
Sólidos Disueltos (g/L)	54,6	4,2	6,1
Nitrógeno Total (g/L)	2,8	0,08	0,1
Proteína (g/L)	14,3	0,7	1,1
Lactosa (g/L)	39,2	1,9	0,01
Carbono Inorgánico Total (mg/L)	108,5	47,1	74,5
Carbono Orgánico Total (mg/L)	31.433	1.489	1.343
Demanda Química de Oxígeno (mg/L)	94.038	5.641	4.708
RECuentos Microbianos (ufc/mL)			
Microorganismos totales	$6,5 \times 10^7$	$4,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^8$
Mohos y levaduras	$1,2 \times 10^7$	$5,4 \times 10^3$	$9,8 \times 10^4$
Bacterias lácticas	$1,1 \times 10^6$	$8,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^7$
Coliformes totales	$1,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^8$

Los valores de pH registrados fueron próximos a la neutralidad en las aguas residuales correspondientes a las queserías pequeña y grande, mientras que el pH de la quesería mediana mostró un valor muy alcalino (pH 10). Este último valor de pH es atribuido a la presencia de agentes cáusticos, a pesar de que se procuró que la recogida de las aguas no coincidiese en horario con las prácticas de limpieza de la industria. La alcalinidad es una característica frecuente en las aguas residuales procedentes de la industria láctea (Bull y col., 1981; Wheatley, 1994; Espigares y col., 1997; Strydom y col., 1997). Además, el pH de las aguas residuales producidas por una misma industria puede oscilar entre 2 y 11 a lo largo de un día, dependiendo de los ciclos de producción, el sistema de producción empleado en cada ciclo (Strydom y col., 1997) y el procedimiento de limpieza aplicado (Bull y col., 1981; Strydom y col., 1997).

La cifra de sólidos totales (ST) en el agua residual de la quesería pequeña resultó ser mucho mayor que la de las otras dos. (Tabla 36). La proporción de sólidos disueltos (SD) respecto a los totales fue elevada en los 3 casos. La cantidad de ST presentes en las aguas residuales de queserías es también un parámetro muy variable, oscilando los valores descritos entre 4 y 59 g/L (Borja y col., 1992; Kalyuzhnyi y col., 1997; Strydom y col., 1997) dependiendo también en este caso de diversos aspectos de los sistemas de producción e higiene.

La mayor cantidad de nitrógeno total, proteínas y lactosa, del agua residual de la quesería pequeña se refleja en valores de CIT, COT y DQO muy superiores a los de las otras dos aguas residuales analizadas (Tabla 36). Las elevadas concentraciones de lactosa y proteína de esta muestra, que representan la casi totalidad de los sólidos disueltos del efluente, revelan una mayor proporción de suero en esa agua residual.

Los valores de DQO, COT y nitrógeno total de las aguas de las queserías mediana y grande no mostraron diferencias significativas, pero la concentración de lactosa y proteína fue superior en la mediana. Esta diferencia puede deberse a los distintos sistemas de aprovechamiento del suero empleados en estas queserías, en el momento de la toma. Mientras que en la quesería grande el suero se deshidrataba en su totalidad para obtener

suero en polvo, en la quesería mediana se elaboraba requesón con parte del suero, vertiendo el resto al agua residual.

Uno de los principales factores que influyen en la composición química de las aguas residuales es el volumen de agua utilizado durante el procesado. Entre el 75 y el 95% del agua utilizada pasa finalmente a formar parte del agua residual (Strydom y col., 1997), obteniéndose, por dilución, una correlación negativa entre el consumo de agua y la concentración de DQO de las correspondientes aguas residuales.

Aparte del volumen de agua utilizado durante el procesado y de los sistemas de aprovechamiento del suero, el nivel de la DQO también depende del momento de la recogida (Strydom y col., 1997), así como de la existencia de algún tipo de tratamiento de depuración de los vertidos (Iglesias, 1994). No es pues de extrañar, que los valores de DQO de vertidos líquidos queseros descritos en la bibliografía oscilen entre 1,3 y 77 g/L (Marwaha y col., 1989; Borja y col., 1992; Iglesias, 1994; Kalyuzhnyi y col., 1997; Strydom y col., 1997).

El análisis microbiológico de las aguas residuales (Tabla 36) mostró un recuento máximo de microorganismos totales en la muestra de la quesería grande, a pesar del bajo contenido en carbono orgánico, probablemente debido a un más largo periodo de espera en el tanque de equilibrado. La cifra de totales de la muestra de la quesería pequeña, un orden de magnitud inferior a la anterior, a pesar del elevado nivel de sólidos disueltos y DQO, es probablemente debida a un periodo muy corto o nulo de espera y equilibrado, o sea, a un vertido directo próximo al lugar de toma de muestra. Por lo que se refiere a la flora total de la quesería mediana, es probable que el bajo recuento sea debido a lo elevado del pH.

Al igual que ocurre en la composición química, la microflora de las aguas residuales procedentes de la industria quesera está sujeta a variaciones, tanto cuantitativas como cualitativas, en función de la calidad de la leche cruda, el tipo de coagulación, el procedimiento de salado, el volumen de procesado, las condiciones higiénico-sanitarias de la industria, etc. Los estudios de cuantificación y caracterización de la flora microbiana de las aguas residuales de la industria láctea son escasos. No obstante, algunos autores han

cifrado entre 10^5 y 10^7 ufc/mL el recuento total de microorganismos de estas aguas (Marwaha y col., 1989; Espigares y col., 1997).

Al estimarse el número de levaduras y mohos se observó que este tipo de flora era particularmente abundante en el agua residual de la quesería pequeña. Es posible que esto sea debido a un menor aislamiento del entorno, debido al pequeño tamaño y relativa sencillez de esta instalación y a su empleo de leche cruda para la elaboración del queso. Marwaha y col. (1989) han estudiado la incidencia de levaduras y mohos en distintas aguas residuales procedentes de una industria láctea productora de leches fermentadas y otros derivados lácteos. Estos autores han observado que la relación entre la flora fúngica y la total suele encontrarse entre 10^3 - $10^4/10^7$.

Obviamente, el número de bacterias lácticas presentes en las aguas residuales de quesería está condicionado al tipo de coagulación empleado en la obtención de la cuajada. La Tabla 36 muestra una flora láctica poco abundante en las aguas de la quesería mediana, lo que era previsible dado que en ella se elabora exclusivamente queso fresco. No es este el caso, en las otras dos industrias. No obstante, en las tres muestras estudiadas, las bacterias lácticas se mostraron un orden de magnitud por debajo de las totales, y fueron menos abundantes que las coliformes.

Aunque en alimentos la detección de bacterias coliformes está asociada a una falta de higiene en las prácticas de fabricación, no deben sorprender los altos recuentos de este tipo de flora fueran muy elevados en las aguas residuales analizadas, ya que en todos los casos dichas aguas incluían las aguas de los servicios del personal (Tabla 36).

2. 3. Caracterización de las levaduras seleccionadas y su eficacia en depuración

2. 3. 1. Actividad láctica

En primer lugar, se estudió la producción de β -galactosidasa durante el cultivo en permeado de las cepas aisladas y de colección seleccionadas anteriormente, empleando como inóculos células precultivadas en medio YM sin lactosa. También, se determinó la actividad

lactásica en el medio libre de células al final del cultivo de las cepas seleccionadas, no detectándose actividad alguna en ningún caso (datos no mostrados).

Como puede verse en las Figuras 31 y 32, la actividad lactásica comenzó a detectarse en todas las cepas a partir de las 14 h de incubación en los cultivos iniciados con 10^4 ufc/mL, salvo en los correspondientes a las cepas del género *Candida* (NCYC 143, NCYC 744 y DF-5), donde apareció dos horas más tarde. El nivel de población en esa fase estaba entre 10^6 y 10^7 ufc/mL. La actividad lactásica no se mantuvo estable a lo largo del cultivo, sino que mostró variaciones en función del tiempo de incubación y de la cepa (Figuras 31 y 32). Al alcanzar la fase estacionaria se observó en todos los casos una disminución de la actividad lactásica llegando a niveles próximos a 0 en las cepas NCYC 151, 1368 y 744, DF-5, AF-9 y AT-10 al final del cultivo (Figuras 31 y 32). En la Tabla 37 se observa que los niveles máximos de producción (expresados en unidades/mg) se alcanzaron en distintos tiempos de incubación dependiendo de la cepa utilizada, correspondiendo sin embargo todos ellos a cerca de 10^8 ufc/mL, o sea, principio de la fase estacionaria.

Como se ve en la Figura 31, las 6 cepas de la colección británica se clasificaron en 2 grupos, según a la actividad lactásica máxima registrada. El primer grupo incluye a aquellas cuya actividad máxima fue inferior a 150 nmoles ONP/min/ 10^7 u.f.c y está constituido por las cepas NCYC 151, 1429, 1368 y 744; el segundo incluye a las cepas NCYC 1548 y 143, las cuales mostraron una actividad mayor a dicho valor (Figura 31). Del mismo modo se pueden agrupar las cepas seleccionadas entre las procedentes de efluentes de quesería, quedando el primer grupo constituido por las cepas DF-5, DF-27, y el segundo por AF-9, AT-7 y AT-10 (Figura 32).

Los valores máximos obtenidos en las cepas pertenecientes al género *Kluyveromyces* oscilaron entre 46 y 380 nmoles ONP/min/ 10^7 ufc; mientras que los correspondientes a las cepas del género *Candida* lo hicieron entre 1,2 y 259 nmoles ONP/min/ 10^7 ufc (Figuras 31 y 32). En este sentido, cabe resaltar la gran capacidad de síntesis de esta enzima observada en la cepa AT-7 (*Kluyveromyces marxianus*) procedente de la quesería pequeña, cuya actividad máxima alcanzó los 380 nmoles ONP/min/ 10^7 ufc (Figura 32), o sea, aproximadamente un 50% más que la cepa de colección más activa, *Candida kefir* NCYC 143.

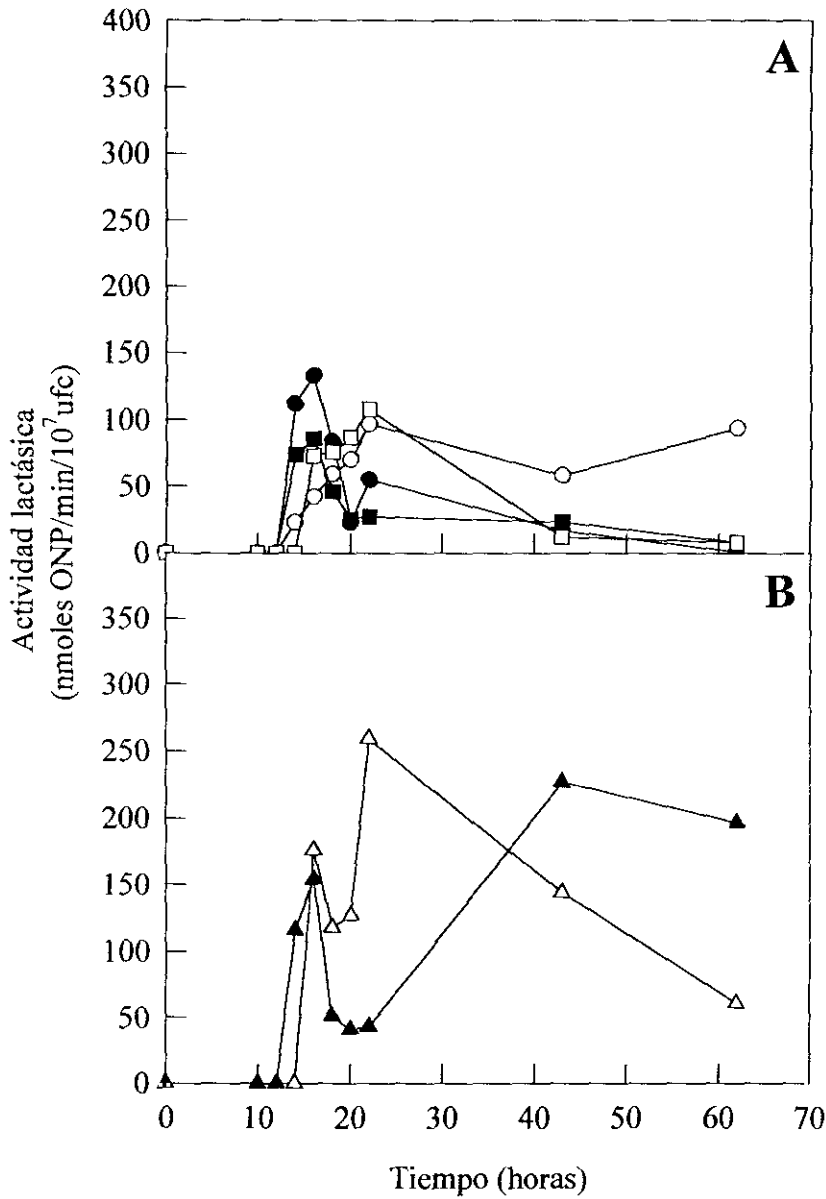


Figura 31. Evolución de la actividad lactásica de las cepas de la colección británica durante su cultivo en permeado. (A) Cepas con baja actividad lactásica (inferior a 150 nmol ONP/min/10⁷ ufc): *K. marxianus* NCYC 151 (●) y NCYC 1429 (○), *K. lactis* NCYC 1368 (■) y *C. kefir* NCYC 744 (□). (B) Cepas con alta actividad lactásica (superior a 150 nmol ONP/min/10⁷ ufc): *C. kefir* NCYC 143 (△) y *K. lactis* NCYC 1548 (▲).

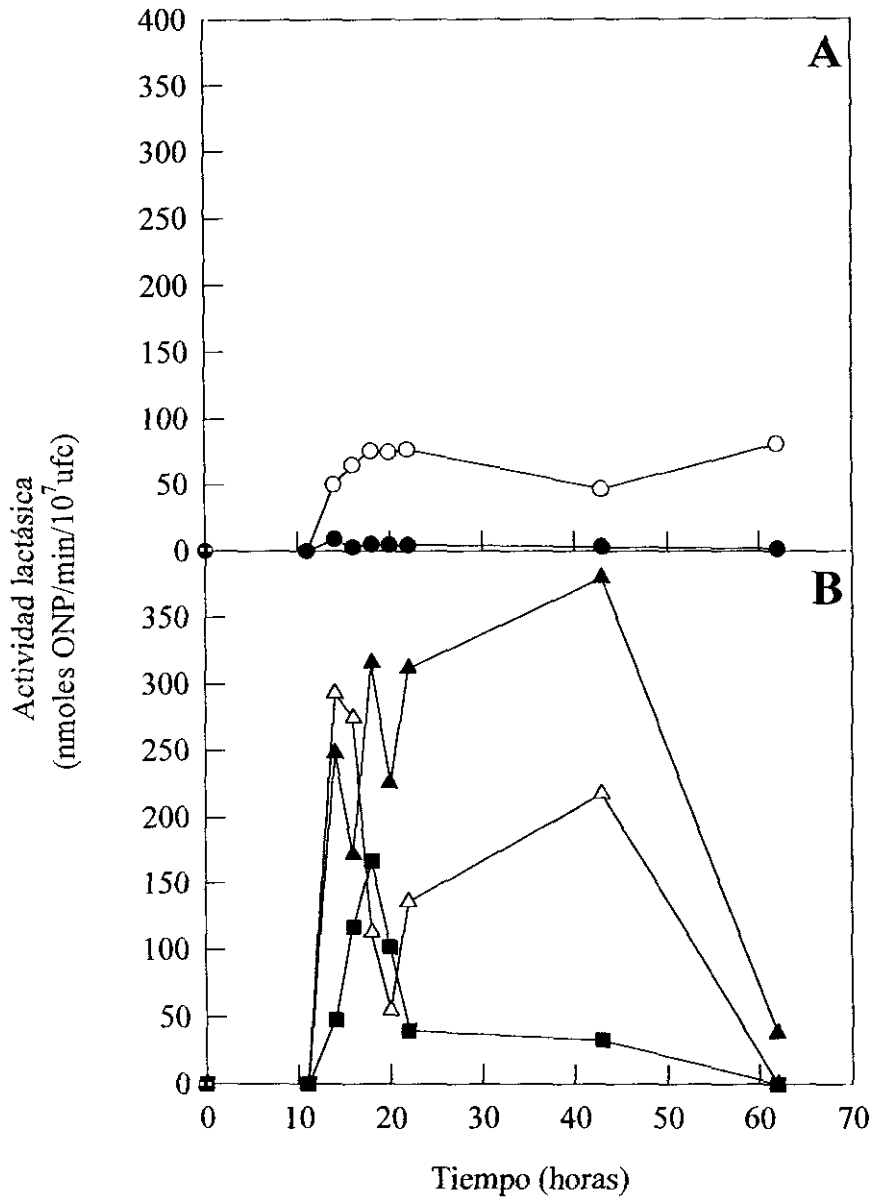


Figura 32. Evolución de la actividad lactásica de las cepas aisladas en este trabajo durante su cultivo en permeado. (A) Cepas con baja actividad lactásica (inferior a 150 nmol ONP/min/ 10^7 ufc): *C. intermedia* DF-5 (●) y *K. marxianus* DF-27 (○). (B) Cepas con alta actividad lactásica (superior a 150 nmol ONP/min/ 10^7 ufc): *K. marxianus* AF-9 (■), AT-7 (▲) y AT-10 (△).

Tabla 37. Actividad lactásica, tiempo de cultivo y recuentos de levaduras correspondientes al valor máximo de actividad lactásica registrado en las cepas anteriormente seleccionadas, cultivadas en permeado.

		Actividad lactásica (unidades/mg célula)	Tiempo de cultivo (horas)	Recuentos (ufc/mL)
Cepas de la colección nacional británica	NCYC 143	1,04	22	$4,2 \times 10^7$
	NCYC 1548	0,92	43	$8,5 \times 10^7$
	NCYC 744	0,43	22	$1,5 \times 10^8$
	NCYC 1429	0,23	43	$2,2 \times 10^8$
	NCYC 151	0,10	20	$2,4 \times 10^8$
	NCYC 1368	0,10	43	$2,5 \times 10^8$
Cepas aisladas en este trabajo	AT-7	1,25	22	$9,5 \times 10^7$
	AT-10	0,87	43	$7,4 \times 10^7$
	AF-9	0,41	20	$1,3 \times 10^8$
	DF-27	0,31	22	$8,8 \times 10^7$
	DF-5	0,01	43	$5,1 \times 10^8$

Parece evidente que el nivel máximo de β -galactosidasa alcanzable no es una característica propia de género o especie, sino específica de cada cepa.

Las oscilaciones en la actividad lactásica observadas en las Figuras 31 y 32 son presumiblemente el resultado de la combinación de efectos inductores e inhibitorios para la síntesis de la enzima ejercidos por la lactosa y los monosacáridos procedentes de su hidrólisis intracelular o presentes en baja concentración en el suero.

Es bien conocido que en *Escherichia coli*, la síntesis de β -galactosidasa es inducida por lactosa (tras convertirse en alolactosa), e inhibida catabólicamente por glucosa (efecto éste que se anula por la adición de cAMP). La presencia de glucosa causa represión de un gran número de genes codificadores de enzimas requeridas para la utilización de otros mono-, di- y oligosacáridos (Melcher, 1997).

La síntesis de β -galactosidasa en levaduras se induce en presencia de lactosa y/o galactosa (Dickson y Markin, 1980; Pedrique y Castillo, 1982; Castillo, 1990) y la velocidad de inducción puede variar de unas cepas a otras (Barbosa y col., 1985). Dickson y Markin (1980) han estimado en 40 min el tiempo mínimo requerido por *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* NCYC 1368 para iniciar la actividad lactásica tras la adición de 8 mM lactosa, requiriéndose además una concentración mínima de entre 1 y 2 mM de lactosa para que tenga lugar dicha inducción. La edad de las células influye en la rapidez e intensidad de la respuesta a la inducción de lactasa por lactosa; Dickson y Markin (1980) observaron que las células jóvenes de *K. lactis* var. *lactis* responden a la inducción en menos tiempo y con mayores niveles de enzima que las células de fase estacionaria. El descenso de actividad lactásica al final del cultivo podría ser pues debido no sólo al agotamiento de la lactosa del permeado, sino también al envejecimiento de las células productoras.

La galactosa tiene un papel más complejo: induce la síntesis de lactasa, pero inhibe la de lactosa-permeasa, y además, parece inhibir la hidrólisis del o-nitro-phenyl- β -D-galactopiranosido (ONPG) catalizada por la lactasa.

La glucosa, por su parte, inhibe la síntesis de lactasa pero no la reacción de hidrólisis enzimática de ONPG. Teniendo en cuenta que concentraciones de glucosa superiores a 0,2 mM actúan como represoras de la síntesis de la enzima en algunas cepas, como *C. kefir* NCYC 744 (Pedrique y Castillo, 1982), es posible que los restos de glucosa presentes en permeado (0,2-1,3 mM) jueguen, temporalmente, un cierto papel represor. Algo análogo ha sido observado por otros autores, creciendo levaduras en medios artificiales con glucosa (Dickson y Markin, 1980; Pedrique y Castillo, 1982).

La lactosa y sus monosacáridos no sólo intervienen en la regulación de la síntesis de la β -galactosidasa, sino que también lo hacen en el transporte de la lactosa al medio intracelular, actuando como inductores o represores de la síntesis de la lactosa-permeasa, como se comenta en el apartado 2. 3. 2. al tratar la velocidad de desaparición de la lactosa.

La mayoría de los estudios previamente publicados sobre rendimientos de lactasa, han sido realizados con suero desproteinizado y empleando distintos suplementos nutritivos, lo

que limita su comparación con nuestros resultados obtenidos con permeado. Por ejemplo, Bales y Castillo (1979) y Siso (1994) al cultivar *C. kefir* NCYC 744 y *K. lactis* var. *lactis* NCYC 1368 (NRRL Y-1140) en este tipo de suero, registraron un máximo de actividad lactásica 4 y 10 veces superior respectivamente, al obtenido en permeado (Tabla 37). Sin embargo, otros autores al cultivar diversas cepas de *K. marxianus* en sueros suplementados, obtienen unos niveles máximos entre 0,24 y 1,36 unidades/mg, próximos a los que nosotros hemos observado en permeado (Sánchez y Castillo, 1980; Barbosa y col., 1985).

Hay que tener en cuenta además, que la concentración de lactosa empleada en los medios descritos en la literatura oscila entre 15 y 80 g/L (Bales y Castillo, 1979; Sánchez y Castillo, 1980; Barbosa y col., 1985; Siso, 1994), lo que puede afectar drásticamente a la magnitud de la síntesis de lactasa (Bales y Castillo, 1979; Dickson y Markin, 1980). Existe una relación directa entre la concentración de lactosa en el medio y el nivel de lactasa, aunque esa relación dependa del tipo de cepa. Diversos autores han estimado entre 73 y 150 g/L la concentración de lactosa necesaria para alcanzar el nivel máximo de producción de β -galactosidasa en distintas cepas de *K. marxianus* y *C. kefir* (Wendorff y col., 1970; Mahoney y col., 1974; Bales y Castillo, 1979). Es posible pues que la concentración natural de lactosa en permeado (43 g/L) esté por debajo de la óptima para obtener el máximo rendimiento de lactasa en las cepas estudiadas.

Puede haber incluso otros factores implicados en los resultados en cuanto a lactasa obtenidos de nuestros cultivos. Uno de ellos podría ser la disponibilidad de oxígeno. Los cultivos en matraz aireados por agitación no proporcionan concentraciones altas de oxígeno en solución (Kato y Tanaka, 1998). Una concentración que llegara a estar por debajo de los 0,01 mmoles O_2 /L podría favorecer la expresión de la lactasa (Mahoney y col., 1974; Barberis y Gentina, 1998). También la temperatura y el pH pueden tener un papel. A este respecto, se ha observado en otras cepas de *Kluyveromyces* y *Candida* que la producción de β -galactosidasa se estimula en un 20% cuando la temperatura de incubación pasa de 30°C a 28°C (Wendorff y col., 1970) y en un 40% cuando el pH inicial del medio es inferior a 4 (Wendorff y col., 1970; Bales y Castillo, 1979; Sonawat y col., 1981).

En todas las cepas aquí recogidas, como en la inmensa mayoría de las descritas de los géneros *Kluyveromyces* y *Candida*, la β -galactosidasa era intracelular (Bales y Castillo, 1979; Castillo, 1990; Bacci Junior y col., 1996). Se ha observado no obstante que algunas cepas de *Kluyveromyces* son capaces de liberar la enzima al medio extracelular (Carvalho-Silva y Spencer-Martins, 1990), lo que indudablemente es una ventaja si se pretende recuperar la lactasa con fines comerciales.

2. 3. 2. Consumo de azúcares vs. DQO

La lactosa del suero es responsable del 70-90% de su carga contaminante (Mickle y col., 1974; Kisaalita y col., 1987), por lo que el consumo de este azúcar debería en principio reflejarse en la DQO. Algunos autores han propuesto la utilización de levaduras para reducir la DQO del suero (Moresi y col., 1980a; De Felice y Scioli, 1994). Por este motivo, se estudió la evolución en permeado y suero, de la concentración de los principales carbohidratos y de la DQO durante el cultivo de las cepas seleccionadas.

2. 3. 2. 1. Cultivo en permeado

A fin de disminuir el tiempo requerido para el agotamiento de la lactosa del permeado, en todos los casos se utilizaron como inóculo células con la β -galactosidasa previamente inducida, tal y como han descrito diversos autores (Mickle y col., 1974; Dickson y Markin, 1980; Pedrique y Castillo, 1982; Dickson y Barr, 1983).

Las Figuras 33 a y 33 A muestran la evolución de la desaparición de lactosa durante el cultivo de las cepas de la colección británica, agrupadas según su nivel de producción de lactasa. Al cabo de 48 h de cultivo, todas las cepas salvo la NCYC 1548, habían utilizado el 100% de la lactosa inicial, con independencia de su capacidad para producir lactasa (Figuras 33 a y 33 A). No se apreciaron diferencias importantes entre estas cepas, en cuanto a la velocidad de consumo del azúcar. Por otra parte, la glucosa y la galactosa, que

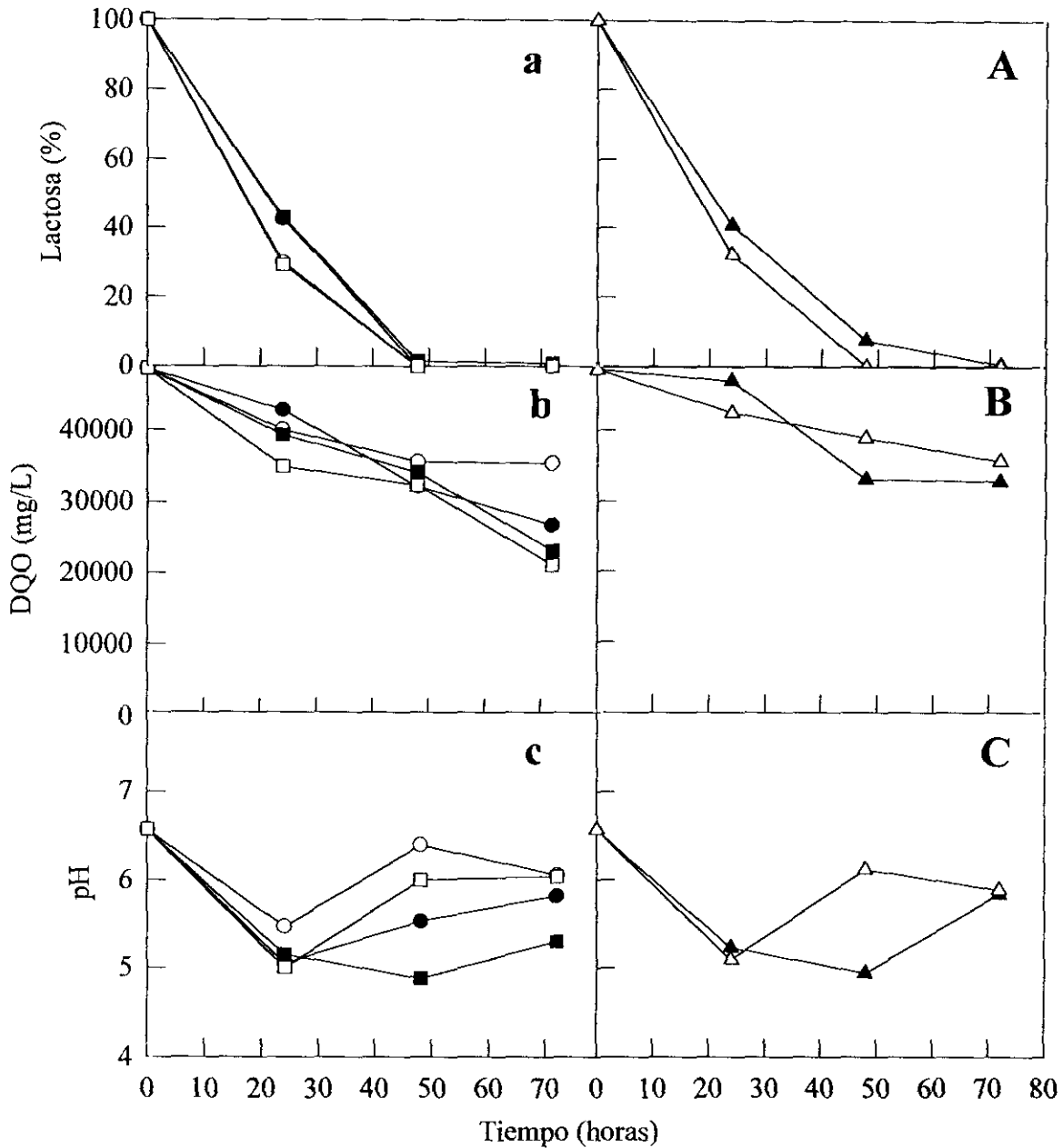


Figura 33. Evolución de la desaparición de la lactosa inicial (%) (a, A), de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg/L) (b, B) y del pH (c, C) durante la incubación en permeado de las levaduras seleccionadas de la colección británica. Letras minúsculas: Cepas con actividad lactásica <150 nmol ONP/min/10⁷ ufc: *K. marxianus* NCYC 151 (●) y NCYC 1429 (○), *K. lactis* NCYC 1368 (■) y *C. kefir* NCYC 744 (□). Letras mayúsculas: Cepas con actividad lactásica > 150 nmol ONP/min/10⁷ ufc: *K. lactis* NCYC 1548 (▲) y *C. kefir* NCYC 143 (△).

partían de concentraciones iniciales de alrededor de 1 mM en ambos casos, desaparecieron en todos los cultivos tras las primeras 24 h de incubación (datos no mostrados).

Al irse determinando los valores de DQO del medio libre de células a lo largo de los cultivos, observamos que la producción de β -galactosidasa no guardaba relación con la disminución de la DQO. Así por ejemplo, en los cultivos de las cepas NCYC 1548, 143 y 1429 disminuyeron poco la DQO (inicialmente 48.700 mg/L y por encima de los 30.000 mg/L al final de la incubación, Figuras 33 b y 33 B). Por el contrario, las cepas NCYC 151, 744 y 1368 redujeron la DQO hasta un 45 - 56% de la concentración inicial (Figura 33 b). Como puede verse en la Figura 33, el agotamiento de la lactosa en los cultivos de estas tres últimas cepas (48 h) no se reflejó de forma inmediata en la DQO, sino que fueron necesarias 24 h más de incubación para conseguir el máximo descenso. Atribuimos ésto a una degradación incompleta de la lactosa, que se traduciría en la acumulación en el medio de productos solubles poco volátiles, sobre todo alcoholes y ácidos orgánicos, como se discute más adelante.

La evolución de la acidez en los distintos cultivos puede verse en las Figuras 33 c y C. En ellas se aprecia que durante el cultivo de las cepas NCYC 1368 y 1548, el pH llegó a ser inferior a 5. Es interesante resaltar que en algunos cultivos (NCYC 143, 744 y 1429), el pH primero disminuye, para alcanzar después valores similares a los iniciales. La acidez podría condicionar la velocidad de crecimiento de las levaduras, cuando desciende a valores de 5 o inferiores.

Llegados a este punto, nos planteamos si la disminución de la DQO podría realizarse con mayor celeridad y eficacia aumentando la concentración celular inicial de los cultivos. Aunque la mayor parte de los autores expresan la concentración del inóculo en unidades de peso, es posible estimar los recuentos celulares iniciales empleados por distintos autores entre 10^7 y 10^9 ufc/mL (Mickle y col., 1974; Bayer, 1983; Ghaly y Sing, 1989; De Felice y Scioli, 1994). En nuestro estudio, hemos observado el efecto de la magnitud del inóculo sobre la DQO empleando niveles iniciales entre 10^4 y 10^7 ufc/m, y utilizando la cepa que había mostrado una mejor aptitud para reducir la DQO, la NCYC 744. Como puede verse en la Figura 34, sólo a corto plazo dan mejor resultado los inóculos grandes.

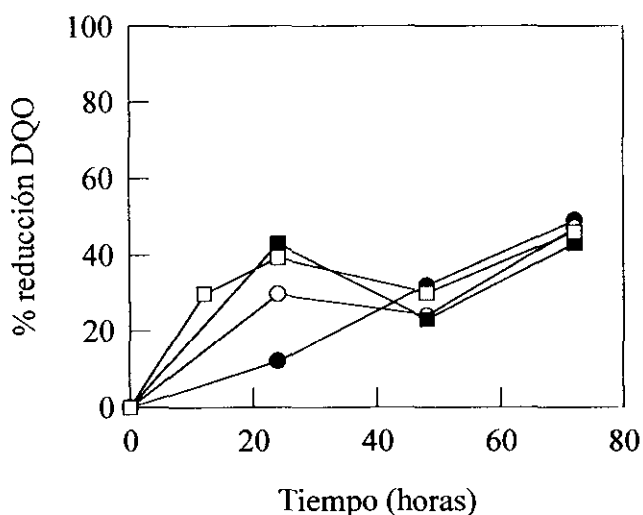


Figura 34. Disminución de la DQO respecto a la inicial (%) durante el cultivo de *C. kefir* NCYC 744 en permeado utilizando distintas concentraciones celulares iniciales: 10^4 (●), 10^5 (○), 10^6 (■) y 10^7 (□) ufc/mL.

Mickle y col. (1974) sin embargo, han descrito un 30 % más de descenso de la DQO del suero al aumentar 5 veces la concentración celular inicial de las levaduras (de 2×10^7 a 1×10^8 ufc/mL). En nuestras condiciones, como obtuvimos aproximadamente un 20% de mejora en velocidad de reducción de la DQO a las 24 h al aumentar el inóculo de 10^4 a 10^5 ufc/mL decidimos emplear este último valor como punto de partida de los cultivos de las cepas aisladas.

En la Figura 35 se muestran los resultados referentes a la evolución de la lactosa, la DQO y el pH en los cultivos en permeado de algunas de las cepas que aislamos de efluentes de quesería. A diferencia de lo observado con las cepas de la colección británica estudiadas anteriormente, en este grupo de cepas sí se observaron diferencias importantes en la velocidad de utilización de la lactosa (Figuras 35 a y A). Destacaron en este sentido, las cepas de *K. marxianus* AT-7 y AT-10, que al cabo de 24 h de cultivo habían consumido un 73 y 61% de la lactosa inicial, respectivamente (Figuras 35 a y A). Estas dos cepas fueron, junto con la AF-9, las que habían mostrado además mayor capacidad de síntesis de lactasa (Figura 32 B). Todas las cepas aisladas de efluentes utilizaron la totalidad de la lactosa del permeado tras 34 h de cultivo (Figuras 35 a y A).

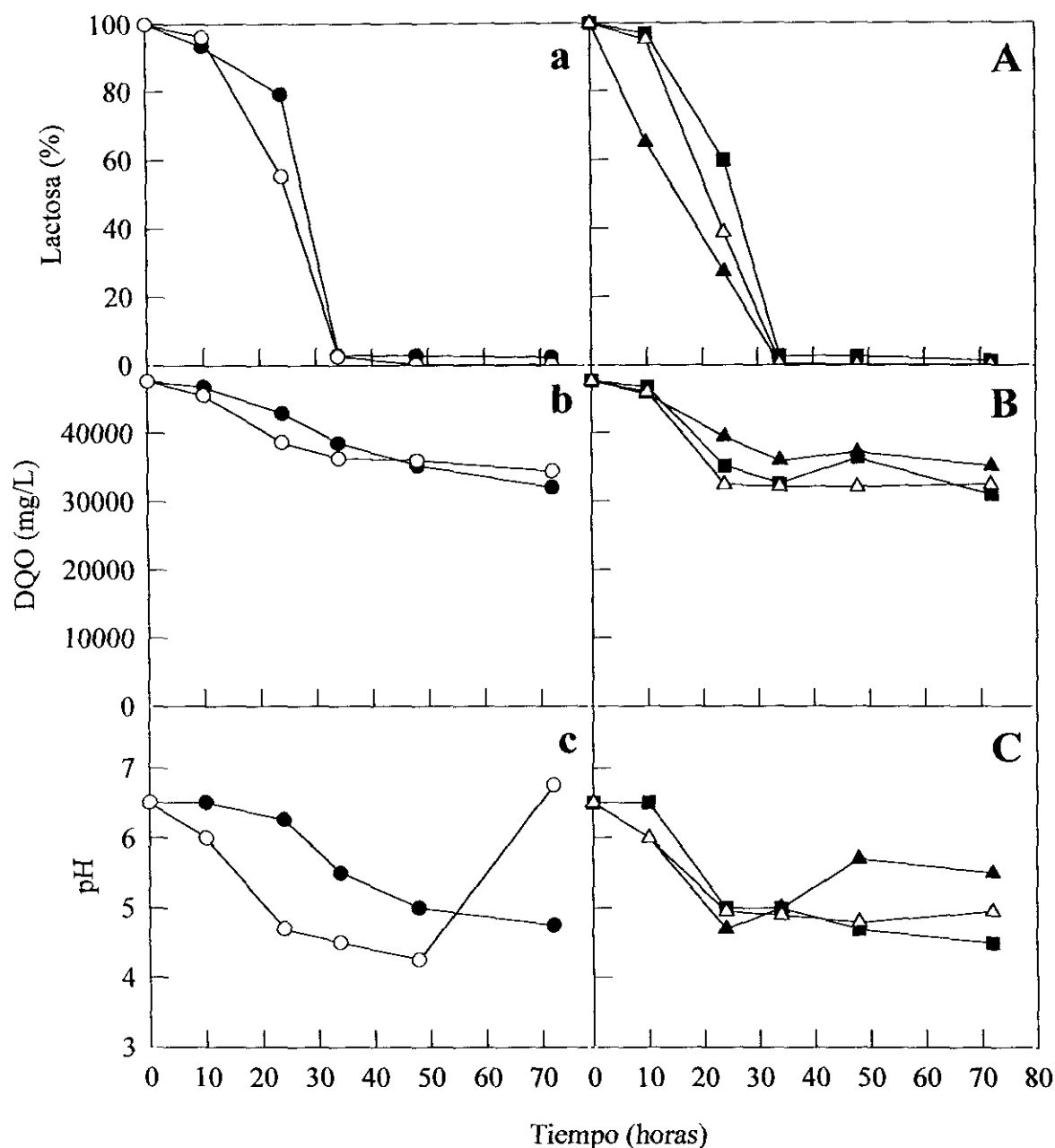


Figura 35. Evolución de la desaparición de la lactosa inicial (%) (a, A), de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg/L) (b, B) y del pH (c, C) durante la incubación en permeado de las levaduras aisladas de efluentes de quesería. Letras minúsculas: Cepas con actividad lactásica <150 nmoles ONP/min/10⁷ ufc: *C. intermedia* DF-5 (●) y *K. marxianus* DF-27 (○). Letras mayúsculas: Cepas con actividad lactásica > 150 nmoles ONP/min/10⁷ ufc: *K. marxianus* AF-9 (■), AT-7 (▲) y AT-10 (△).

La evolución de las concentraciones de glucosa y galactosa no se diferenció significativamente de la ya descrita para las levaduras de la colección británica (datos no mostrados).

En todos los cultivos de cepas de efluentes, los descensos de la DQO registrados (Figuras 35 b y 35 B) fueron inferiores a los obtenidos con las cepas de la colección británica (Figuras 33 b y B), a pesar de que se utilizó un inóculo con una concentración celular superior. Ninguna de las cepas empleadas fue capaz de reducir la DQO del permeado por debajo de los 30.000 mg/L tras 72 h de cultivo (Figuras 35 b y B). Este hecho se observó incluso en los cultivos de aquellas cepas con mayor capacidad de síntesis de lactasa y velocidad de consumo de lactosa (AT-7, AT-10 y AF-9).

La evolución del pH en estos cultivos se muestra en las Figuras 35 c y C, donde se puede apreciar que sólo en el correspondiente a la cepa DF-27, se registraron valores inferiores a 5. Atribuimos la disminución del pH observada en nuestros cultivos a la producción de ácidos orgánicos y CO₂ como resultado del metabolismo fermentativo de la lactosa. La subida del pH registrada al final del cultivo podría deberse a la utilización como sustrato de parte de los metabolitos secundarios acumulados en el medio, tras el agotamiento de otros nutrientes de uso preferente (Reinbold y Takemoto, 1988; González Siso y col., 1996).

Hay que tener en cuenta que la desaparición de la lactosa del permeado puede verse también afectada por la concentración de oxígeno y el pH del medio, ya que estos factores condicionan el transporte de este azúcar al interior de la célula. A este respecto, *K. marxianus*, *K. lactis* y *C. kefir* en condiciones aerobias transportan la lactosa mediante el sistema protón-simporte inducible, en el que participa la permeasa transportadora (Dickson y Markin, 1980; van der Broek y van Steveninck, 1982; Boze y col., 1987; Carvalho-Silva y Spencer-Martins, 1990), limitándose enormemente dicho transporte cuando el oxígeno escasea (Sims y col., 1984; Barnett, 1992). Sin embargo, algunas cepas de estas especies son capaces en ausencia de oxígeno de continuar transportando la lactosa mediante el sistema de difusión facilitada (Barnett y Sims, 1982). Aunque de forma excepcional, este último mecanismo de transporte se ha observado en algunas cepas de *K. marxianus*

(Carvalho-Silva y Spencer-Martins, 1990). Por otra parte, el valor óptimo de pH para el transporte de la lactosa se ha estimado entre 4 y 5 (Dickson y Barr, 1983), valores éstos próximos a los alcanzados en nuestros cultivos.

La actividad lactosa-permeasa y la inducción de esta enzima en presencia de azúcares, pueden jugar un papel en la velocidad de desaparición de la lactosa. Es sabido que concentraciones de lactosa y glucosa en el medio de alrededor de 111 y 14 mM, respectivamente, pueden ser suficientes para inhibir el transporte de lactosa en ciertas levaduras (Pedrique y Castillo, 1982; Dickson y Barr, 1983). La velocidad de desaparición de la lactosa del medio está pues íntimamente relacionada con su transporte y puede variar entre especies. Los valores descritos de K_m para el transporte oscilan desde 10 μ M para *C. kefir* NCYC 744 (Castillo, 1990), hasta 2,8 mM para *K. lactis* var. *lactis* NCYC 1368 (Dickson y Barr, 1983).

La pobre correlación observada entre la desaparición de la lactosa del permeado y la disminución de la DQO, parece ser consecuencia de las rutas metabólicas parcialmente anaerobias al parecer seguidas para la degradación del azúcar. Las especies estudiadas rinden mayoritariamente ATP, CO₂ y H₂O como productos finales del catabolismo de la lactosa en condiciones de óptima aerobiosis (Gancedo y Serrano, 1989; Inchaurredo y col., 1994). Este balance tendría un efecto máximo sobre la DQO del medio libre de células. Sin embargo, en condiciones de escasez de oxígeno estas mismas levaduras producen distintos metabolitos intermedios, muchos de los cuales solo son parcialmente volátiles y se acumulan en el medio extracelular, contribuyendo a su DQO. Son productos de este metabolismo parcialmente anaerobio, el etanol (Moresi y Sebastiani, 1979; De Felice y Scioli, 1994, Jiang, 1995; González Siso y col., 1996; Kiers y col., 1998), acetaldehído, etilacetato, n-butanol, n-propanol, alcohol isoamílico, etc. (De Felice y Scioli, 1994; Jiang, 1995) y diversos ácidos orgánicos. Para favorecer la eliminación de estos metabolitos del medio durante el cultivo de *K. marxianus* y reducir así más la DQO, Moresi y col (1980b) proponen aumentar la temperatura de incubación a 34°C para acelerar el proceso y optimizar la volatilización de parte de los productos finales. También la concentración de lactosa del medio determina el predominio de una u otra vía metabólica

(respiratoria o fermentativa) (Castrillo y Ugalde, 1993). Así, Siso (1994) ha observado que *K. lactis* NCYC 1368 puede producir un 50% más de etanol al aumentarse la lactosa del medio de 30 a 50 g/L.

En función de los resultados obtenidos en este apartado seleccionamos para las siguientes experiencias, las cepas NCYC 151, 744 y 1368, AT-7, AT-10 y AF-9.

2. 3. 2. 2. Cultivo en permeado suplementado

La adición de distintas fuentes de nitrógeno y/o de fósforo, en concentraciones comprendidas entre 0,2-2% y 0,4-0,5%, respectivamente, ha sido practicada para optimizar el crecimiento y el uso de las fuentes de carbono, por parte de las levaduras cultivadas en sueros desproteinizados y efluentes lácteos (Moresi y col., 1980a; Bayer, 1983; Marwaha y col., 1988b). Ante la posibilidad de que el crecimiento en permeado de las cepas seleccionadas fuera deficiente en nitrógeno y/o fósforo, ensayamos el efecto de la suplementación conjunta con sulfato amónico y fosfato dipotásico al 0,5% (De Felice y Scioli, 1994) sobre la reducción de la DQO en los correspondientes cultivos. Tal y como se muestra en las Figuras 36 y 37, la citada suplementación del permeado no sólo no favoreció el descenso de la DQO, sino que en algunos casos se redujo menos (cepas NCYC 151 y AT-10).

Aunque el sulfato amónico es usado frecuentemente como suplemento de los cultivos de levaduras para favorecer el rendimiento de biomasa o la reducción de la DQO de sueros lácteos (Moresi y col., 1980a; Bayer, 1983; De Felice y Scioli, 1994), su efecto no siempre es positivo. La adición de más de un 0,1% de esta sal a efluentes lácteos inoculados con determinadas cepas de *K. marxianus* para reducir su DQO, tiene un resultado adverso, según Marwaha y col. (1988b). Estos autores observaron que con ese suplemento la reducción final de la DQO era un 30-50 % inferior a la obtenida en el cultivo control, lo que es similar al registrado en nuestro cultivo de la cepa NCYC 151. Según los mismos autores, la baja eficacia mostrada por el sulfato amónico para suplementar el crecimiento y reducir la DQO, podría deberse a que esas levaduras asimilan esta sal de forma incompleta

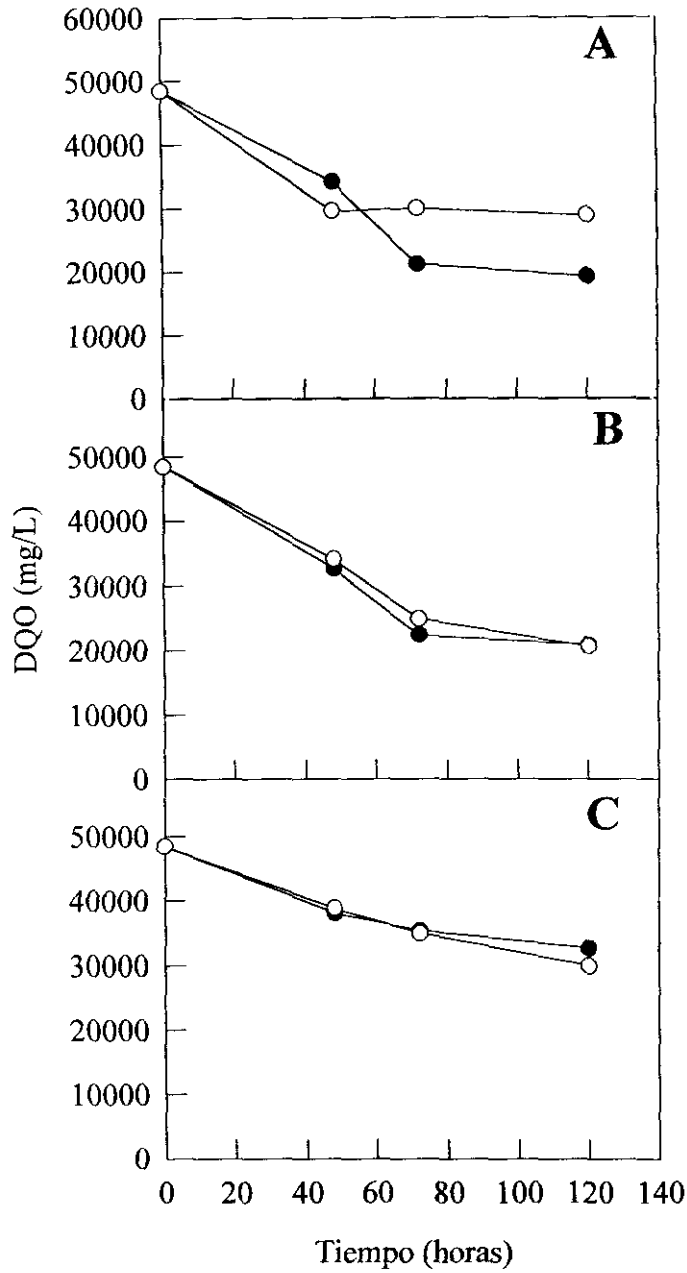


Figura 36. Evolución de la DQO (mg/L) durante el crecimiento de las cepas de colección *K. marxianus* NCYC 151 (A), *C. kefir* NCYC 744 (B) y *K. lactis* NCYC 1368 (C) en permeado (●) y en permeado con sulfato amónico y con fosfato dipotásico al 0,5% (p/v) (○).

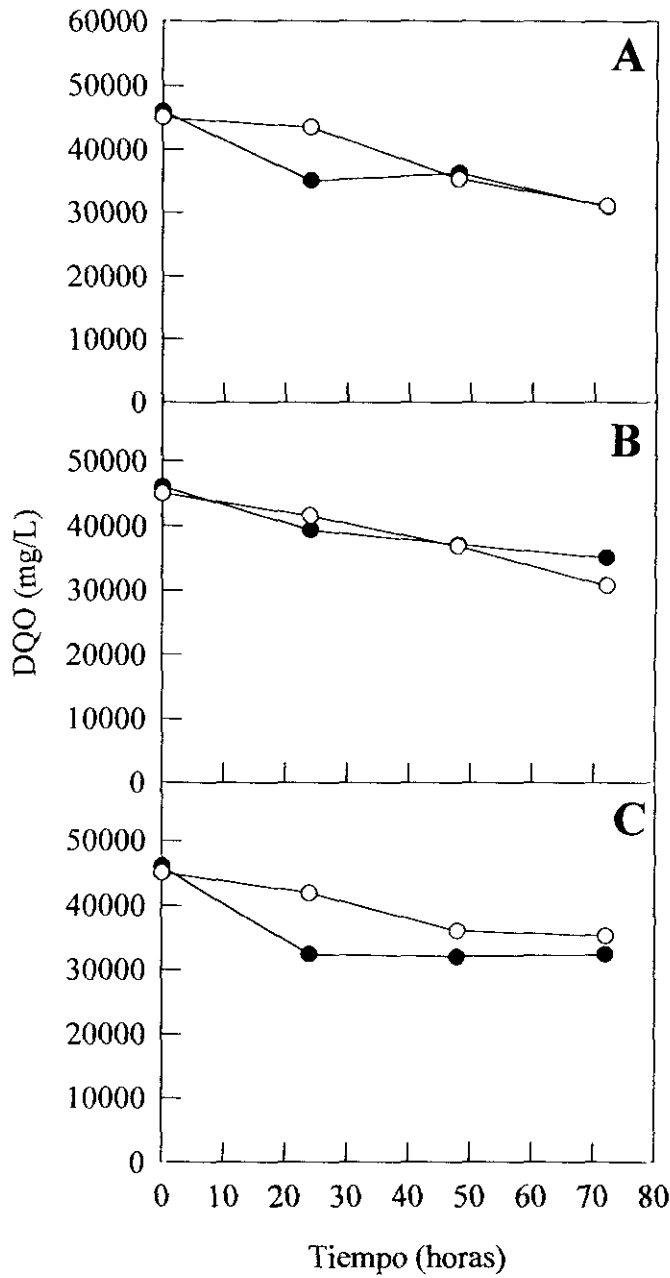


Figura 37. Evolución de la DQO (mg/L) durante el crecimiento de las cepas aisladas de efluentes *K. marxianus*AF-9 (A), AT-7 (B) y AT-10 (C) en permeado (●) y en permeado suplementado con sulfato amónico y con fosfato dipotásico al 0,5% (p/v) (○).

o a que se induce una acumulación de iones amonio en el medio que ejerce un efecto inhibitor, parcial o total, sobre la asimilación del nitrógeno orgánico.

Al igual que el amonio, el fósforo suele incluirse entre los suplementos para mejorar el crecimiento de levaduras en medios naturales procedentes de leche (Moresi y col., 1980a; De Felice y Scioli, 1994). Aunque no disponemos de datos sobre el efecto individual que el fósforo ejerce en los cultivos para la reducción de la DQO, sí se ha descrito que a concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,5 %, favorece el crecimiento y la utilización de lactosa en cepas de *K. marxianus* (Wendorff y col., 1970; Harju y col., 1976). Sin embargo, este efecto positivo no se ha observado en cultivos de *C. kefir* (Bales y Castillo, 1979).

2. 3. 3. *Sedimentación espontánea*

Dado que ninguna de las cepas de levadura seleccionadas resultó tener buena capacidad de floculación, nos propusimos determinar si eran capaces al menos de sedimentar de forma natural aunque fuera lentamente después de su cultivo en permeado. Esta capacidad podría ser explotada para concentrar las células, antes de su separación, una vez finalizado el crecimiento y por tanto, el tratamiento con ellas del suero o permeado.

Al estudiar la sedimentación en ampollas de decantación durante 5 h a temperatura ambiente de cultivos en reposo, sin aireación, de las 5 mejores cepas, observamos que 3 de ellas las NCYC 151, AF-9 y AT-7 decantaban con un frente de separación nítido, concentrándose las células, tras 5 h en menos del 50% del volumen inicial (Tabla 38). Los cultivos de las cepas NCYC 744 y AT-10, por el contrario, no llegaron a presentar este tipo de frente.

Como puede verse en la Tabla 39, tras las 5 h de reposo, en todos los casos se recuperaron más del 50% de las células en la mitad inferior del volumen del líquido de cultivo. Las mayores tasas de recuperación corresponden a los cultivos de las cepas NCYC 151 y AF-9 con porcentajes de recuperación de células en torno al 90%.

Tabla 38. Desplazamiento del frente de separación durante la sedimentación de levaduras, expresado como % del volumen que resulta clarificado.

Tiempo (min)	NCYC 151	NCYC 744	AF-9	AT-7	AT-10
0	0	0	0	0	0
30	1	nd	15	40	nd
60	2	nd	20	50	nd
120	20	nd	35	50	nd
180	25	nd	45	nd	nd
240	45	nd	50	nd	nd
300	60	nd	55	nd	nd

nd. El frente no era nítido.

Tabla 39. Tasas de recuperación de levaduras, decantadas en la mitad inferior del volumen del líquido tras 5 h de sedimentación.

	NCYC 151	NCYC 744	AF-9	AT-7	AT-10
Tasa recuperación (%)	89	80	96	67	67

El tiempo del ensayo es crítico para la comparación de los resultados de floculación (Tablas 27 y 32), registrados tras sólo 3 minutos de observación de cultivos jóvenes, y los de sedimentación espontánea, en los que las 5 h de reposo permiten una intervención de dos fenómenos, el estrictamente físico-químico, de agregación de partículas, con el biológico, de envejecimiento del cultivo. Un trabajo de Calleja (1987) estudia algunos de los procesos implicados; a tiempos largos y concentraciones de células altas, se van agregando paulatinamente las células que cuando se reúnen en grupos o flóculos de más de 10 unidades, decantan a velocidad notoriamente superior.

La sedimentación libre tiene lugar por la fuerza de la gravedad de acuerdo con la ley de Stokes (Earle, 1988), que en principio sólo es aplicable cuando el flujo es laminar y las partículas, esféricas:

$$v_s = \frac{D^2 g (\rho_p - \rho_l)}{18 \eta} \quad \text{donde:}$$

D = diámetro
G = fuerza de la gravedad
 ρ_p = densidad de la partícula sólida
 ρ_l = densidad del líquido
 η = viscosidad del líquido

Sin embargo, se ha comprobado que también cuando el movimiento de partículas es de tipo browniano, como es el caso de las células de levaduras y sus agregados en condiciones fisiológicas (Calleja, 1987), la velocidad de sedimentación se ajusta a esta ley (Mafart y Béliard, 1994) estando en función del diámetro del flóculo agregado. Según la misma ley de Stokes, incluso las células individuales de las levaduras incapaces de flocular *terminarían decantando*, ya que su densidad (1,05-1,1 g/L) (Schmidt-Kastner y Gölker, 1987) es superior a la del permeado utilizado (1,004 g/L).

2. 3. 4. Crecimiento en suero

Después de analizar los resultados de los cultivos de las levaduras en permeado, donde no hay otro tipo de células, nos propusimos comprobar su comportamiento, en cuanto a crecimiento, consumo de lactosa y reducción de la DQO, en suero crudo de quesería donde hay una microbiota variada, competidora o quizás incluso antagonista. El suero dulce utilizado como medio de cultivo tenía unos recuentos totales de 1×10^2 ufc/mL y un número de bacterias lácticas de aproximadamente un orden de magnitud inferior. Como puede verse en la Figura 38, el número de microorganismos totales, tanto en los cultivos inoculados con levaduras, como en el suero control, alcanzó alrededor de 10^9 ufc/mL tras 24 h de incubación a 30°C. En esta misma figura se observa que al final del cultivo todas las cepas de levadura habían superado las 10^7 ufc/mL, salvo la AT-10, cuyo máximo nivel de crecimiento fue de alrededor de 10^6 ufc/mL, probablemente por ser la más fácilmente antagonizada por las bacterias lácticas.

A pesar del bajo nivel inicial de microorganismos del suero empleado, cuando se compararon las curvas de crecimiento de las cepas de levadura en suero y permeado, se observó que en todos los casos los niveles alcanzados en suero fueron inferiores, exceptuando el caso de la cepa NCYC 151, cuyas cifras finales fueron similares en ambos

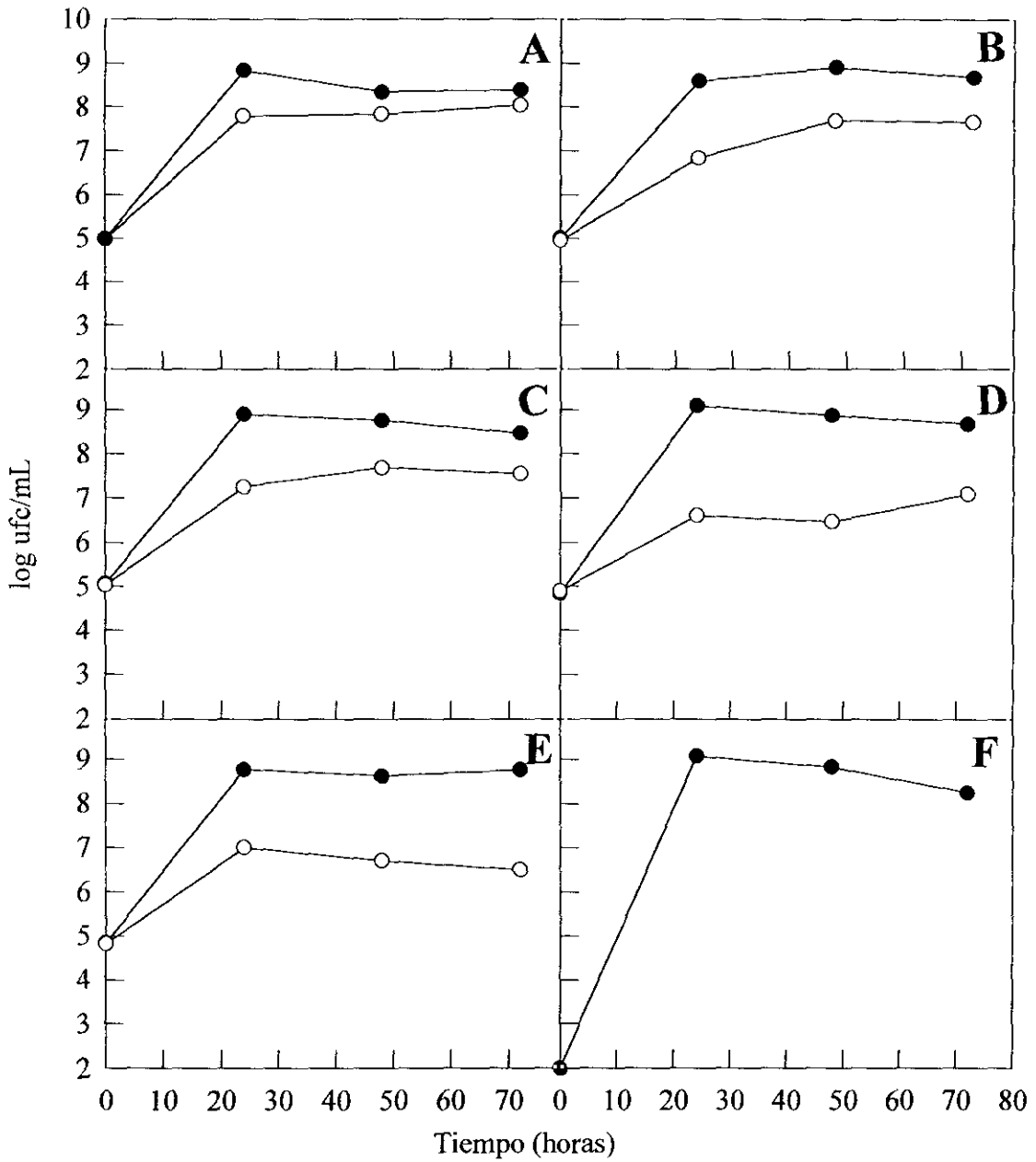


Figura 38. Crecimiento de microorganismos totales (●) y de levaduras (○) a lo largo del cultivo en suero crudo dulce de las cepas *K. marxianus* NCYC 151 (A), *C. kefyr* NCYC 744 (B), *K. marxianus* AF-9 (C), AT-7 (D), AT-10 (E) y control (F).

medios (Tabla 40). Ante la obvia ventaja de disponer de una mayor disponibilidad de N en suero que en permeado, el suero crudo presenta serios inconvenientes para el crecimiento de las levaduras. Las bacterias lácticas crecen más deprisa que ellas, compiten por los mismos sustratos y producen diversos metabolitos de efecto antagonista, como se comenta más adelante.

En la Tabla 41 se observa como el pH inicial del suero (6,6) bajó hasta 4,2 en el control en tan sólo 24 h de incubación. Los pHs de los sueros inoculados con las cepas NCYC 151 y 744 y AT-7 fueron los que mostraron un menor descenso durante toda la incubación (Tabla 41). En general, para todas las cepas de levadura ensayadas, los descensos de pH registrados en los cultivos en suero fueron más acusados que los registrados en permeado (Figuras 33 y 35, Tabla 41).

En la Figura 39 A se observa que sólo en los cultivos con las cepas NCYC 151 y AT-10 se registró una velocidad de consumo de la lactosa apreciablemente mayor que en suero control (no inoculado), habiéndose utilizado aproximadamente el 60% de la concentración inicial de este azúcar tras 24 h de incubación (frente a un 10% en el control). Además, se comprobó que al finalizar el cultivo de la cepa AF-9 todavía quedaba un 15 % de la lactosa inicial, igual que en el suero control (Figura 39 A).

Al comparar los porcentajes de desaparición de la lactosa en los cultivos en suero y permeado, se aprecia que sólo las cepas NCYC 151 y AT-10 mostraron consumos similares en ambos medios a las 24 h de cultivo (Tabla 42). En este mismo tiempo, el resto de las cepas habían utilizado, al crecer en suero crudo, entre un 20 y un 54 % menos de lactosa del consumido al crecer en permeado (Tabla 42).

El valor de DQO del suero aquí empleado fue de 60,000 mg/L, lo que supone un 30% más de carga contaminante que su correspondiente permeado (Figuras 33 b y B y Figura 39 B). Al estudiar la evolución de la DQO del suero libre de células, durante el cultivo de las cepas de levadura seleccionadas, observamos que la AT-7, AT-10 y NCYC 151 fueron las que redujeron este parámetro en mayor medida, proporcionando porcentajes de reducción del 34, 30 y 23%, respectivamente (Figura 39 B). Las dos últimas cepas

Tabla 40. Recuentos de levaduras (u.f.c./mL) durante su cultivo en suero y permeado.

Tiempo (horas)	NCYC 151		NCYC 744		AF-9		AT-7		AT-10	
	Suero	Permeado	Suero	Permeado	Suero	Permeado	Suero	Permeado	Suero	Permeado
0	$9,8 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$8,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$	$9,1 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$
24	$6,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$7,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$
48	$6,9 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$	-	$6,9 \times 10^8$
72	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$3,4 \times 10^6$	$6,4 \times 10^8$

señaladas habían destacado también por su mayor velocidad de degradación de la lactosa del suero (Figura 39 A). Al comparar la capacidad de las cepas de reducir la DQO en ambos medios, se observa que sólo una cepa, la AT-7 proporcionó un mejor resultado en suero que en permeado (Tabla 43).

Tabla 41. Evolución del pH durante la incubación de levaduras en suero crudo.

<i>Tiempo</i>	Control	NCYC 151	NCYC 744	AF-9	AT-7	AT-10
<i>0 h</i>	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
<i>24 h</i>	4,2	5,0	4,6	4,2	5	4,2
<i>48 h</i>	4,1	4,7	4,7	4,2	4,6	4,3
<i>72 h</i>	4,5	4,8	5	4,1	4,5	4,5

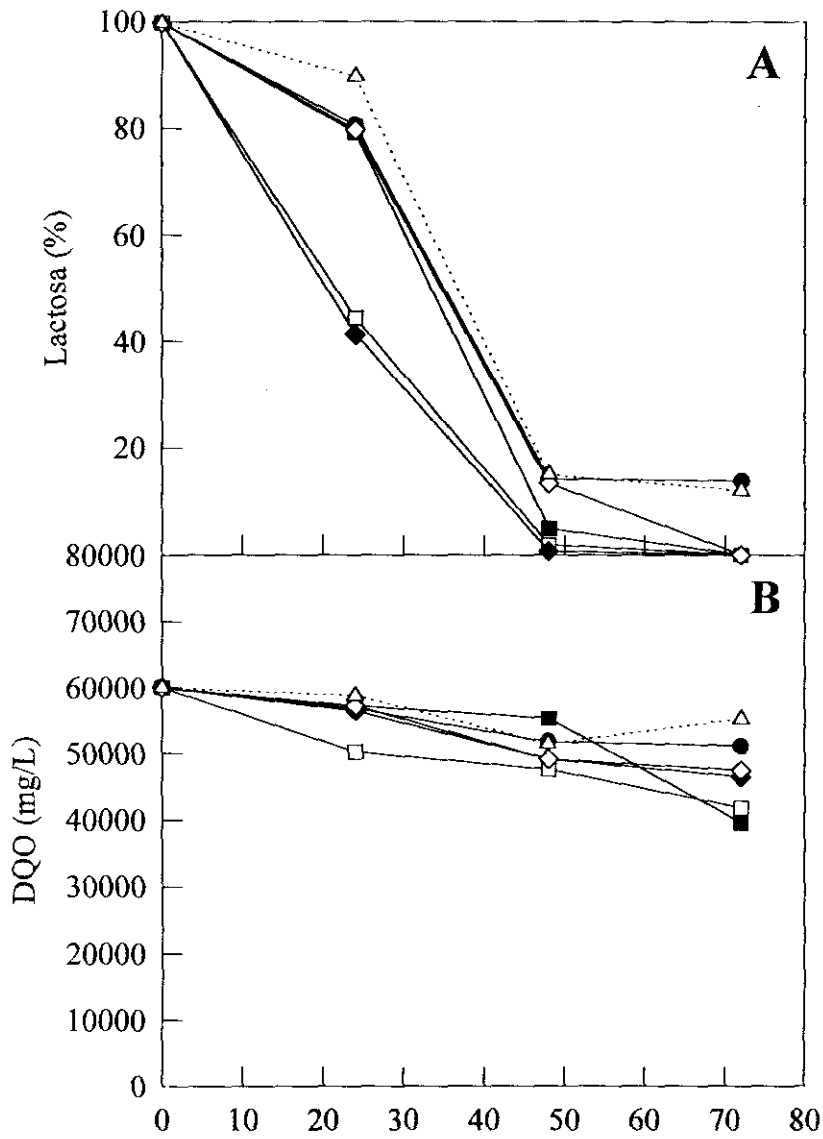


Figura 39. Evolución de la desaparición de la lactosa inicial (%) (A) y de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg/L) (B) de las cepas seleccionadas durante su cultivo en suero crudo dulce. *C. kefir* NCYC 744 (◇), *K. marxianus* NCYC 151 (◆), AF-9 (●), AT-7 (■), AT-10 (□) y control (△).

Tabla 42. Porcentaje de desaparición de la lactosa inicial (%) durante el cultivo de las levaduras en suero y permeado

Tiempo (horas)	NCYC 151		NCYC 744		AF-9		AT-7		AT-10	
	Suero	Permeado	Suero	Permeado	Suero	Permeado	Suero	Permeado	Suero	Permeado
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	58,6	62	20,2	74	19,4	40	26,7	73	55,6	62
48	99,3	99,9	86,7	99,9	85,8	97	95	100	98,1	99,8
72	99,3	100	99	100	86,2	98	99	100	99	99,8

Tabla 43. Reducción de la DQO (%) durante el cultivo de las levaduras en suero y permeado a las 72 h de cultivo.

Cepas	Suero	Permeado
<i>NCYC 151</i>	23	31
<i>NCYC 744</i>	20	34
<i>AF-9</i>	15	35
<i>AT-7</i>	34	26
<i>AT-10</i>	30	32

Conviene recordar que la carga microbiana inicial, y en particular, el nivel de bacterias lácticas en el suero aquí empleado, es particularmente bajo. Esto se debe a la buena calidad higiénica de la leche cruda y al queso elaborado (de Burgos), obtenido por coagulación enzimática y sin adición de cultivos iniciadores lácticos. Es obvio que las diferencias de resultado entre permeado y suero, serían mucho más acusadas, de emplearse sueros ácidos.

Las limitaciones para crecimiento en suero crudo de las levaduras utilizadoras de lactosa, parecen ser resultado de las interacciones con los otros tipos de flora allí presentes, particularmente con las bacterias lácticas. Es bien conocido que la flora láctica puede ejercer un efecto antagonista sobre otros microorganismos gracias a la producción de diversos ácidos orgánicos, metabolitos derivados del oxígeno (entre ellos, H_2O_2), antibióticos, etc (Piard y Desmazeaud, 1991 y 1992; De Vuyst y Vandamme, 1994; Ouwehand, 1998). La acumulación de ácidos en el suero y el consiguiente descenso del pH, no parece ser sin embargo el factor limitante para el crecimiento de *K. marxianus*, pues esta especie tolera bastante bien pHs de hasta 4 (Wendorff y col., 1970; De Sanchez y

Castillo, 1980; Praphailong y Fleet, 1997). Algunos de los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas, como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno y el etanol (De Vuyst y Vandamme, 1994; Ouwehand, 1998) tienen poco efecto sobre el crecimiento de *C. kefir* y *K. marxianus*, ya que estas levaduras pueden utilizarlos y/o degradarlos (Lodder, 1971; Kocková-Kratochvílová, 1990). No obstante, se han descrito otros compuestos que sí pueden ejercer un efecto inhibitor del crecimiento de las levaduras, como es el caso del diacetilo y los ácidos acético y benzoico, cuya acción depende del pH del medio (Jay, 1982; Moon, 1983; De Vuyst y Vandamme, 1994; Ouwehand, 1998). El ácido benzoico a concentraciones superiores al 0,025% inhibe el crecimiento de *K. marxianus* a pH 4 (Praphailong y Fleet, 1997). *Lactobacillus reuteri*, una especie que abunda en el tracto gastrointestinal de los mamíferos, pero puede encontrarse con cierta frecuencia en leche de vaca cruda (Casas y col., 1998), produce reuterina, un compuesto antimicrobiano capaz de inhibir a la flora fúngica, en presencia de glicerol. Dado que *K. marxianus* y *C. kefir* son capaces de producir glicerol a partir de la lactosa del permeado (Jenq y col., 1989; Rapin y col., 1994), es posible que en nuestras condiciones la reuterina llegara a sintetizarse. Por otra parte, uno de los aminoácidos mayoritarios del suero es, como ya se ha mencionado anteriormente, el ácido glutámico (Glass y Hedrick, 1977a; Zall, 1992), que puede ser utilizado por algunas bacterias lácticas (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus bovis*) para producir ácido piroglutámico (Ouwehand, 1998). Este compuesto ejerce un efecto inhibitor importante sobre bacterias Gram-negativas y positivas (Ouwehand, 1998), pero aún no se conoce su efecto sobre levaduras.

Es posible que la menor velocidad de degradación de lactosa mostrada por las levaduras cuando se cultivan en suero en vez de en permeado, se deba a que pueden utilizar otros sustratos, producidos por las bacterias presentes en el suero. En este sentido, se ha descrito que además de liberar ácido láctico y otros ácidos orgánicos al medio extracelular, algunas bacterias lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus acidophilus*) también pueden excretar galactosa, procedente de la hidrólisis intracelular de la lactosa (Axelsson, 1998). La galactosa y el ácido láctico son utilizados por *K. marxianus* con una K_m aparente de 1,2 y 0,42 mM, respectivamente (Boze y col.,

1987; Fonseca y col., 1991), lo que indica una mayor preferencia por dichos sustratos que por la lactosa (K_m de 2 mM) (Boze y col., 1987).

Aunque no disponemos de datos de otros autores sobre la reducción de la DQO del suero mediante el cultivo de levaduras en condiciones de baja aireación, Harden (1996) ha publicado que la DBO_5 del suero se reduce un 30% menos que la del permeado tras el cultivo de *Kluyveromyces marxianus* en condiciones de aireación forzada. Esta diferencia podría deberse a una mayor acumulación de compuestos procedentes del metabolismo anaerobio de las levaduras y del resto de la flora presente en el suero, como lo demuestran los valores finales de pH, más bajos en suero que en permeado.

Para la comparación de los efectos sobre la DQO de los cultivos en suero, conviene recordar que existen considerables diferencias cuali- y cuantitativas en cuanto a composición de sueros, según el proceso de elaboración de queso del que procedan. Asimismo, de un mismo suero pueden obtenerse distintos permeados, según el tamaño de poro de la membrana de ultrafiltración, y el intervalo de tiempo transcurrido antes de efectuar la operación de ultrafiltración, que permita un mayor o menor grado de proteolisis.

2. 4. Optimización en fermentador de los cultivos en permeado

En este estudio se utilizó un fermentador con aireación regulada para evitar la excesiva producción de etanol, y para mejorar la reducción de la DQO, baja en los cultivos en matraz, debido presumiblemente a la insuficiente aireación.

En los cultivos en fermentador de *C. kefir* NCYC 744, el aporte de 1 volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto (v.v.m.), no fue suficiente para mantener un nivel constante de oxigenación; a las 10 h de incubación la presión parcial de oxígeno (pO_2) estaba ya próxima al 0% (datos no mostrados). Además, aunque el crecimiento y el consumo de lactosa fueron más rápidos en fermentador que en matraz, sólo se consiguió una reducción de la DQO del 57% (datos no mostrados). Al ser la disminución de la DQO nuestro principal objetivo, las siguientes fermentaciones se realizaron con bombeo de O_2

puro, requiriéndose en algunas fases del cultivo un flujo de hasta 1,6 v.v.m. a una presión aproximada de 1 bar, para mantener una pO_2 del 60%.

2. 4. 1. Aireación forzada

Al final de la incubación (48 h) en permeado con aireación forzada, el crecimiento de las cepas NCYC 744, 151 y AT-7 había superado las 10^8 ufc/mL (Figura 40 A). Expresando en peso el crecimiento final de la biomasa proteica (g/L) se puede comprobar que el mayor rendimiento correspondió a la cepa NCYC 744 (7 g/L), siendo el de las cepas NCYC 151 y AT-7, respectivamente, un 6 y un 27% inferior (Tabla 44).

En todos los casos con aireación forzada se produjo un descenso de pH, que fue menos acusado en el caso de la cepa NCYC 151 (Figura 40 B). En el cultivo de la cepa NCYC 744, sin embargo, y a partir de las 35 h, el pH comenzó nuevamente a elevarse hasta alcanzar un valor próximo al del permeado inicial (Figura 40 B). Es probable que esto se deba a la utilización de algunos de los ácidos orgánicos y /o alcoholes formados.

En la Figura 40 C se observa que a las 24 h de incubación de los cultivos de las 3 cepas ensayadas, se había agotado completamente la lactosa inicial del permeado, siendo la evolución de la utilización de este azúcar muy similar en todos los casos.

En la Figura 40 D puede verse cómo la DQO del permeado había descendido considerablemente al final del cultivo de las cepas NCYC 744 y 151, alcanzándose porcentajes de reducción del 86 y 89%, respectivamente, coincidentes con las tasas de reducción del Carbono Orgánico Total (COT) (Figura 40 D y Tabla 44). La cepa AT-7 redujo la carga contaminante del permeado en un porcentaje bastante menor.

En la Tabla 44 puede verse también que a las 48 h de incubación la reducción de sólidos totales del líquido libre de células del cultivo de AT-7, fue un 10% inferior a la registrada en los cultivos de las cepas de la colección británica. En esta misma tabla se muestra la determinación del Carbono Inorgánico Total (CIT) a las 48 h, que para las 2 cepas de colección no varió significativamente por efecto del cultivo (Tabla 44).

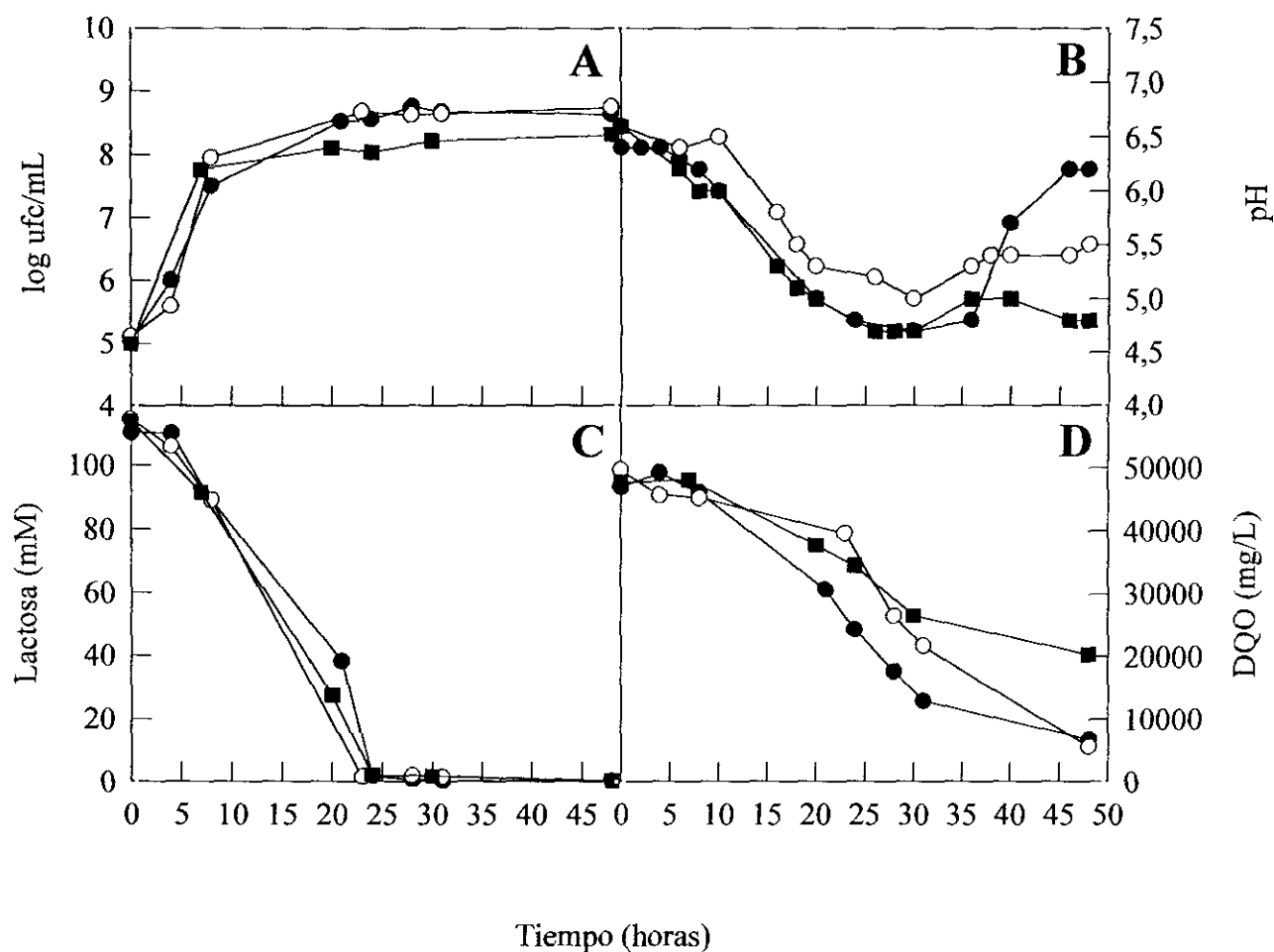


Figura 40. Cultivos de *C. kefir* NCYC 744 (●), *K. marxianus* NCYC 151 (○) y *K. marxianus* AT-7 (■) en permeado a 30°C, 200 rpm y aireación mantenida al 60% pO₂. (A) Crecimiento, (B) pH, (C) lactosa y (D) DQO.

Tabla 44. Características de los cultivos en permeado de 3 de las cepas de levadura, tras 48 h de incubación con una pO_2 constante del 60%.

Cepa	ST (g/L)	Biomasa (g/L)	Recuentos (ufc/mL)	CIT (mg/L)	COT (% reducción)	DQO (% reducción)
NCYC 744	14,7	7,0	$4,4 \times 10^8$	97	86	86
NCYC 151	14,7	6,6	$5,7 \times 10^8$	111	84	89
AT-7	19,2	5,1	$2,1 \times 10^8$	-	-	60

- Sólidos totales (ST) del sobrenadante libre de células (g/L), biomasa proteica (g/L), recuentos de levaduras (ufc/mL), Carbono Inorgánico Total (CIT) (mg/L), Carbono Orgánico Total (COT) (%) y Demanda Química de Oxígeno (DQO).

- ST inicial del permeado: 46 g/L.

- CIT inicial del permeado: 70 mg/L.

El crecimiento en 48 h de las cepas NCYC 744 y 151 a lo largo de la incubación en fermentador con aireación forzada fue 3 veces superior al mostrado en matraz (Tablas 40 y 44). Por el contrario, la cepa AT-7 creció de manera similar. Otros autores han observado mejores rendimientos de biomasa al cultivar diversas cepas de *K. marxianus* y *C. kefir* en sueros desproteinizados o en medios que contenían lactosa al aumentar más o menos la aireación. Así, con unos incrementos de aireación mínimos (de 0 a 0,15 v.v.m.), Ghaly y El-Taweel (1995a) multiplicaron por 1,3 sus recuentos celulares de *C. kefir*. Del mismo modo, Barberis y Segovia (1998) aumentaron un 56% la biomasa final de *K. marxianus* al aportar a un cultivo no aireado una aireación del 30% de saturación. Vananuvat y Kinsella (1975) incrementaron en un 175% el rendimiento en biomasa, utilizando 1 v.v.m., tras aumentar la agitación de 300 a 700 rpm. Podemos considerar, en conjunto, que el rendimiento en biomasa de las 3 cepas estudiadas cultivadas en permeado con aireación forzada fue al menos aceptable (5,1 – 7 g/L), pues aunque se han descrito rendimientos de entre 4 y 11,4 g/L al cultivar diferentes cepas de *K. marxianus* en este mismo medio con niveles de aireación inferiores a los nuestros (1 v.v.m.) (Vananuvat y Kinsella, 1975; Mahmoud y Kosikowski, 1982), otros autores han publicado cifras de 5,3 g/L cultivando

esta especie en suero desproteinizado por calentamiento, que es más rico en nutrientes (Harden, 1996).

Como ya se había observado anteriormente en matraces, la máxima reducción de la DQO de los cultivos en fermentador no se alcanzó hasta 24 h después de agotarse la lactosa, coincidiendo con una recuperación del pH (Figura 40). La aireación aumentada mejoró en un 34% el descenso de la DQO con la cepa AT-7, y en más de un 50% con las cepas NCYC 744 y 151 (Tablas 43 y 44). En algunos trabajos (Gholson y Gough, 1980; Ghaly y Singh, 1989) se describen cultivos de *K. marxianus* en sueros (pasterizados o esterilizados), que registran en 24 h porcentajes de reducción de la DQO del 67 y del 42% respectivamente, cifras similares a las obtenidas por nosotros con las cepas NCYC 744, NCYC 151 y AT-7, en tiempos comparables y partiendo de inóculos menos concentrados. Otros autores sin embargo han obtenido porcentajes de reducción de la DQO próximos al 90% tras cultivar determinadas cepas de *K. marxianus* en sueros o sueros desproteinizados (no permeados) suplementados con alguna fuente de nitrógeno y/o de fósforo (Moresi y col., 1980b; De Felice y Scioli, 1994; Harden, 1996). Pese a que estos autores trabajaron con niveles de aireación inferiores a los nuestros (flujos de aire de entre 0,5 y 1,2 v.v.m), obtuvieron esos resultados con tiempos de incubación más cortos que los nuestros, debido presumiblemente a la mayor riqueza del medio, o al mayor tamaño del inóculo.

Es probable que, a pesar de mejorar la aireación, no consiguiéramos evitar la producción de etanol y otros metabolitos, ya que cuando se agotó la lactosa, el valor de la DQO todavía era más del 50% del inicial, en las 3 cepas estudiadas (Figura 40 D). El pH por otra parte mostraba aun valores bajos (Figura 40 B) y se podían detectar sensorialmente fuertes aromas afrutados. Dado que se parte de un permeado con un contenido en Sólidos Totales (ST) de 46 g/L, y de eso, 43 g/L son de lactosa, el nivel final de Sólidos Totales (Tabla 44), aproximadamente un 25% del inicial, parece corresponder a la porción no volátil de los productos finales de la fermentación. En este sentido, Barberis y Segovia (1998) han descrito que el mantenimiento del oxígeno disuelto al 30% reduce la producción de etanol en un 76% (no sobrepasando los 0,94 g/L) al cultivar *K. marxianus* en un medio con 42,6 g/L de lactosa. Sin embargo, otros autores han señalado

anteriormente que incluso en condiciones de máxima aireación, *Kluyveromyces*, debido a su metabolismo respirofermentativo, sigue produciendo ciertas cantidades de etanol (Moulin y col., 1981; Castrillo y Ugalde, 1993; Inchaurredo y col., 1994; González Siso y col., 1996; Kiers y col., 1998). Esta fermentación de *Kluyveromyces marxianus* en condiciones aerobias ha sido atribuida a desequilibrios entre el incremento del flujo glucolítico (consecuencia de la alta concentración de lactosa) y su capacidad respiratoria que es limitante (Castrillo y Ugalde, 1993). Debido a este desequilibrio, se acumula gran cantidad de pirúvico, que se desvía hacia la formación de etanol y otros compuestos. No obstante, la evolución de la DQO posterior al agotamiento de la lactosa parece indicar que casi todos los metabolitos producidos durante la fermentación, responsables de la DQO final, o son utilizados por las levaduras una vez agotada la lactosa (crecimiento diáuxico) o ven favorecida su volatilización gracias al efecto purgante que proporciona el sistema de aireación.

Se puede plantear pues el interrogante de cómo afecta a las células el mantenimiento de un nivel tan elevado de oxigenación (el 60% de la saturación del aire corresponde aproximadamente a 690 $\mu\text{M O}_2/\text{L}$). A este respecto, varios autores han resaltado la importancia de la concentración del oxígeno sobre la regulación del metabolismo energético y la síntesis de las proteínas y otros compuestos que combaten el estrés oxidativo (Poyton y Burke, 1992; Bunn y Poyton, 1996; Burke y col., 1997). Burke y col. (1997) han observado que los genes que codifican las subunidades de la citocromo oxidasa *c* (la principal consumidora de oxígeno) alcanzan su mayor nivel de expresión cuando la concentración de oxígeno es de 200 $\mu\text{M O}_2$ (aproximadamente el 100% de saturación del aire); a medida que desciende esta concentración, desciende la expresión de esta enzima y por tanto, la energía que se genera durante la fosforilación oxidativa. Se conoce también que varios de los genes que codifican enzimas que pueden atenuar el estrés oxidativo en levaduras (catalasas A y T), son inducidas por el oxígeno (Hörtner y col., 1982; Bunn y Poyton, 1996).

2. 4. 2. Suplementación con nitrógeno y fósforo

El cultivo aerobio de levaduras para la producción de proteína unicelular (SCP – Single Cell Protein-) suele tener generalmente a la depuración como uno de sus objetivos (Ghaly y Singh, 1989; Ghaly y El-Taweel, 1995b). Varios autores señalan que cuando la finalidad del cultivo es la producción de biomasa, caso en que la formación de etanol y otros compuestos orgánicos es indeseable, los requerimientos nutritivos de las levaduras se deben incrementar, siendo insuficientes los sustratos naturalmente presentes en el suero (Castillo, 1990; Kilara y Patel, 1992). Dado que varios autores han conseguido descensos de la DQO del 90% en periodos de tiempo más cortos a los nuestros, suplementando los medios (sueros y sueros desproteinizados) con fuentes de nitrógeno y/o de fósforo y mejorando la aireación (Moresi y col., 1980b; De Felice y Scioli, 1994; Harden, 1996), intentamos emular estos rendimientos adicionando conjuntamente al permeado sulfato amónico y difosfato potásico, ambos al 0,5% (p/v).

Con la suplementación se obtuvo un mayor crecimiento de la cepa NCYC 744 (un 16% más de biomasa) pero la evolución del pH y la velocidad de consumo de lactosa de las cepas NCYC 744 y 151 fueron similares a las observadas en los cultivos sin suplementación (Figuras 41 A *versus* 40 A, Tablas 45 *vs.* 44). A pesar de la mayor producción de biomasa en el cultivo suplementado de la cepa NCYC 744, la reducción de la DQO y de los Sólidos Totales fue inferior a la obtenida en el control (Figuras 41 D *vs.* 40 D y Tablas 44 y 45). El descenso del COT observado en los cultivos suplementados de NCYC 744 y 151 coincidió con el de sus respectivas DQOs, y el CIT fue ligeramente inferior al de los correspondientes cultivos control (Tabla 45 *vs.* 44).

El ligero aumento de biomasa en los cultivos suplementados de NCYC 744, fue similar al observado por Harden (1996) al suplementar suero desproteinizado con un 2% de nitrógeno para el cultivo de *K. marxianus* (no se especifica el grado de aireación). Sin embargo, otros autores que han estudiado el efecto de la suplementación con sulfato amónico al 1%, no han observado ningún efecto aparente en el crecimiento de diversas cepas de *Kluyveromyces marxianus*, al cultivarlas en permeado con una aireación de 1 v.v.m. (Mahmoud y Kosikowski, 1982).

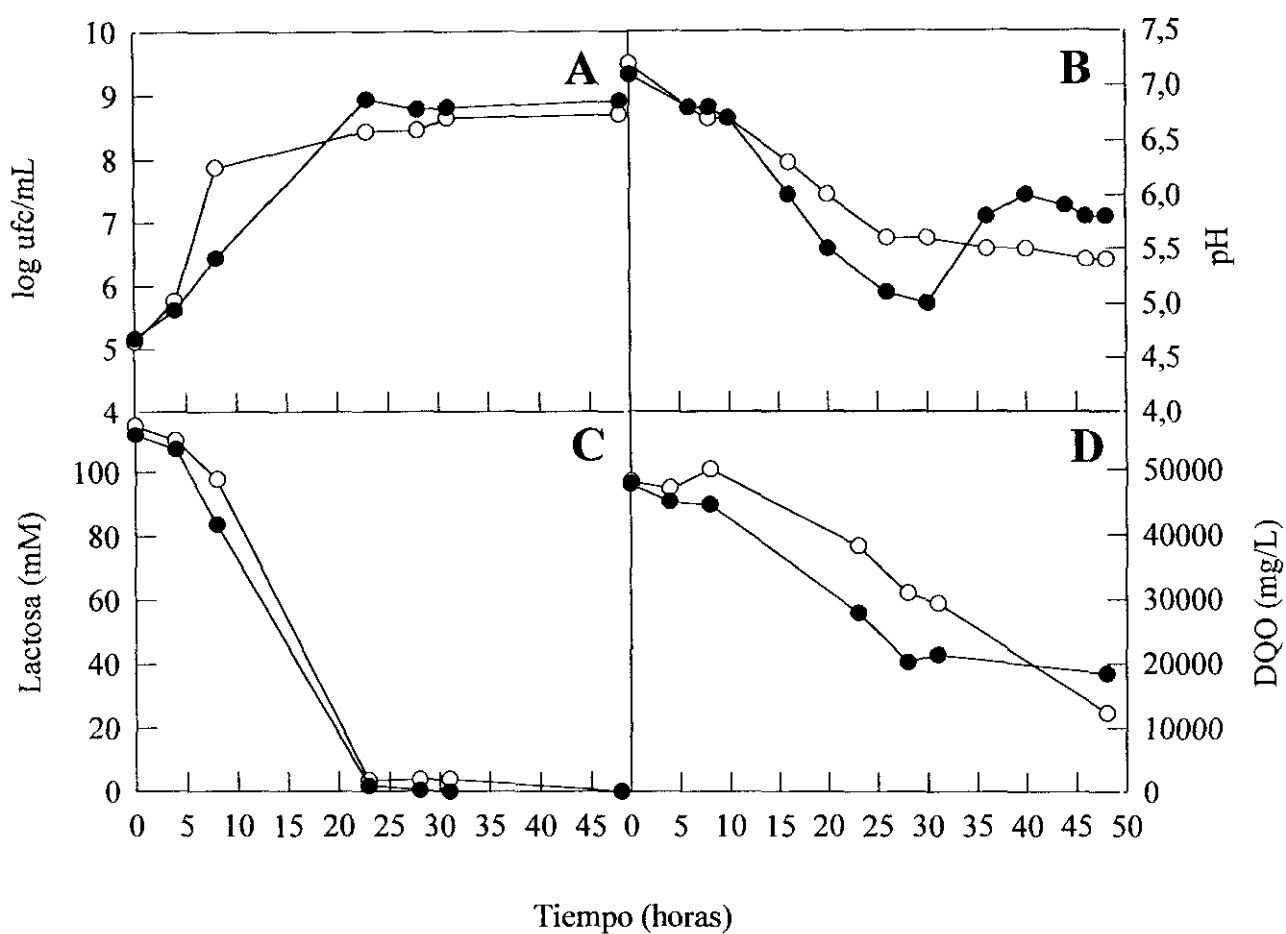


Figura 41. Cultivos de *C. kefir* NCYC 744 (●) y *K. marxianus* NCYC 151 (○) en permeado a 30°C, 200 rpm y aireación mantenida al 60% pO₂, suplementados SO₄(NH₄)₂ y K₂PO₄ al 0,5% (p/v). (A) Crecimiento, (B) pH, (C) lactosa y (D) DQO.

Tabla 45. Características de los cultivos en permeado de las cepas *C. kefir* NCYC 744 y *K. marxianus* NCYC 151, tras 48 h de incubación con una pO_2 constante del 60% y suplementación de $SO_4(NH_4)_2$ y K_2HPO_4 al 0,5% (p/v).

Cepa	ST (g/L)	Biomasa (g/L)	Recuentos (ufc/mL)	CIT (mg/L)	COT		DQO	
					(mg/L)	(%)	(mg/L)	(%)
Inicial	46	-	$\approx 10^5$	70	21.045	-	48.262	-
NCYC 744	19,3	8,1	$8,2 \times 10^8$	49	7.575	64	19.287	59
NCYC 151	22,1	6,0	$5,1 \times 10^8$	67	5.400	74	12.355	75

- Sólidos totales (ST) del sobrenadante libre de células (g/L), biomasa proteica (g/L), recuentos de levaduras (ufc/mL), Carbono Inorgánico Total (CIT) (mg/L), Carbono Orgánico Total (COT) (mg/L y % de reducción) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg/L y % de reducción).

En conjunto los descensos de la DQO obtenidos fueron inferiores a los obtenidos sin suplementación (Figuras 36, 40 y 41). Tanto en permeado como en permeado suplementado, la cepa NCYC 151 fue la que mostró mejores resultados en cuanto a disminución de la DQO, lo que podría atribuirse a su menor capacidad fermentativa.

2. 4. 3. Suplementación con hierro

El contenido en hierro del permeado es bastante pobre (4,1-16 μM) (Zall, 1992). Este metal es necesario sobre todo para la síntesis de enzimas implicadas en los procesos respiratorios de las levaduras. Considerando que el mantenimiento de las células con una aireación equivalente al 60% de saturación, podría provocar un desequilibrio metabólico debido a la escasez de este nutriente, adicionamos cloruro férrico a una concentración de 2 mM a los cultivos de la cepa que había mostrado una mejor aptitud para reducir la DQO (*K. marxianus* NCYC 151).

Paradójicamente, como resultado de este enriquecimiento, el crecimiento al inicio de la incubación fue ligeramente inferior que el mostrado por el control (Figuras 42 A vs. 40

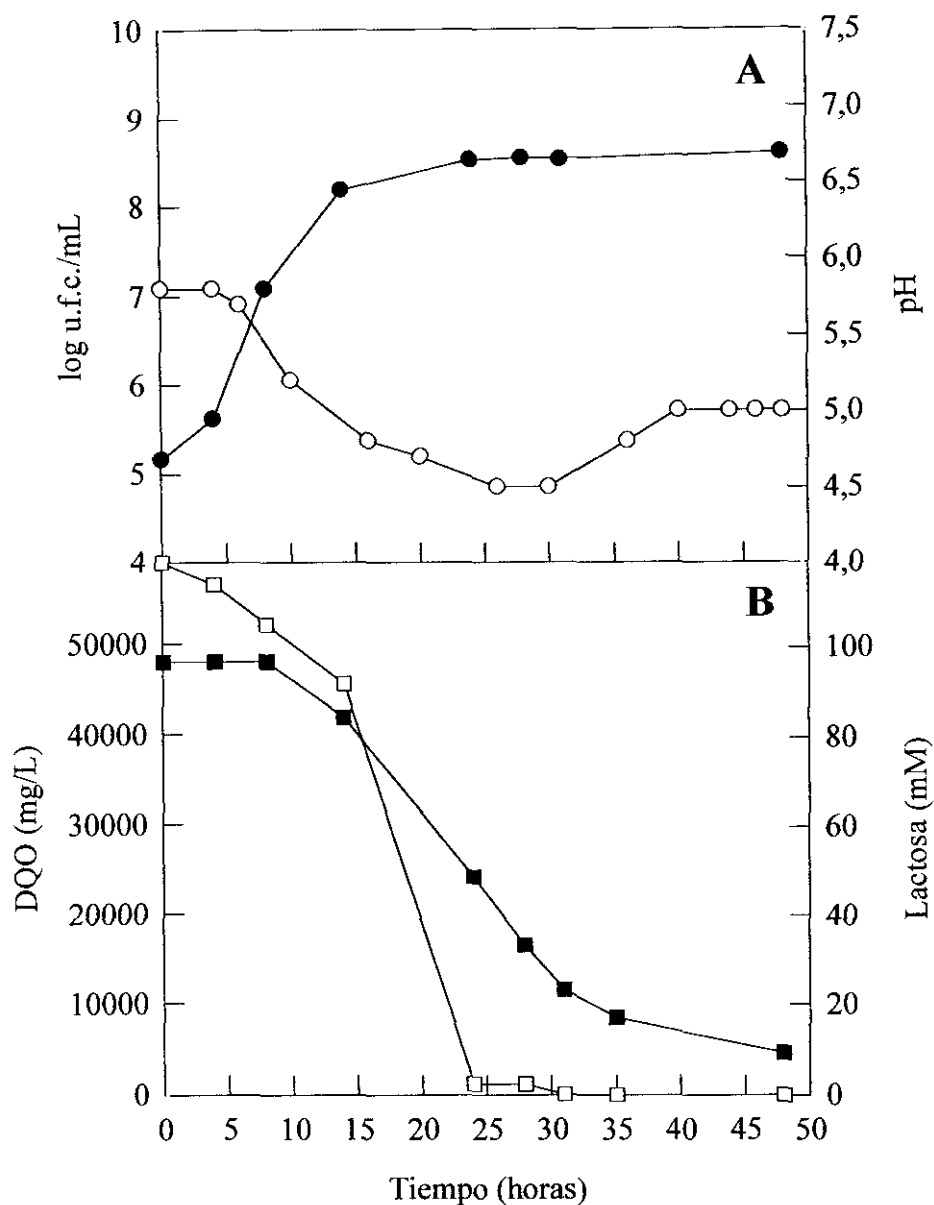


Figura 42. Cultivo de *K. marxianus* NCYC 151 en permeado a 30°C, 200 rpm y aireación mantenida al 60% pO₂, suplementado con Cl₃Fe 2 mM. (A) Crecimiento (●) y pH (○), (B) Evolución de la DQO (■), lactosa (□).

A). Al finalizar el cultivo no se registraron diferencias destacadas en cuanto a número y peso celular (sólo un 3% superior que el control) (Tablas 44 y 46). La adición de hierro no modificó significativamente ni la evolución del consumo de lactosa ni el pH (Figuras 40 B y C vs. 42 A y B), ni tampoco el descenso de la DQO, que tan sólo fue un 1,5% superior al del control (Figuras 40 D y 42 B). La reducción del COT coincidió nuevamente con la de la DQO (Tabla 46). Finalmente, comprobamos que los sólidos totales se redujeron tan sólo un 0,6% respecto al control sin suplementar (Tablas 44 y 46).

De Felice y Scioli (1992) sugieren que concentraciones de cloruro férrico 3 mM mejoran la producción de biomasa de *K. marxianus* en un 13%. Sin embargo, esta cepa se cultivó en un suero ya suplementado con nitrógeno, fósforo y extracto de levadura, por lo que, esa mayor producción podría deberse al aporte de mayor cantidad de nutrientes distintos del hierro.

La escasa mejora sobre la reducción de la DQO, parece sugerir que la suplementación con hierro es inoperante para nuestros fines, y/o en nuestras condiciones. O porque no sea éste el nutriente limitante, o porque contribuya, junto con el abundante oxígeno, al estrés oxidativo de las células.

Tabla 46. Características de los cultivos en permeado de *K. marxianus* NCYC 151 tras 48 h de incubación con una pO_2 constante del 60% y suplementación de cloruro férrico 2 mM.

Cepa	ST (g/L)	Biomasa (g/L)	Recuentos (ufc/mL)	CIT (mg/L)	COT (% reducción)	DQO (% reducción)
NCYC 151	14,4	6,8	$4,1 \times 10^8$	93,8	90	91,4

- Sólidos totales (ST) del sobrenadante libre de células (g/L), biomasa proteica (g/L), recuentos de levaduras (ufc/mL), Carbono Inorgánico Total (CIT) (mg/L), Carbono Orgánico Total (COT) (%) y Demanda Química de Oxígeno (DQO).
- ST inicial del permeado: 46 g/L.
- CIT inicial del permeado: 70 mg/L.

V. CONCLUSIONES

1. Para comprobar su aptitud para crecer en el líquido ultrafiltrado (permeado) del suero de quesería, se seleccionaron 11 cepas de levadura de las colecciones española y británica, capaces de utilizar lactosa y pertenecientes a los géneros *Kluyveromyces*, *Candida* y *Debaryomyces*. Las cepas de este último género crecían muy lentamente en este medio; el resto lo hacían con tiempos de duplicación de 70 a 100 horas. La velocidad de utilización de lactosa de cada cepa no se correlacionó con su actividad lactásica. En la mayoría de las cepas se observaron dos máximos de actividad lactásica a lo largo del crecimiento en permeado. El máximo de actividad registrada fue de 250 nmoles de ONP/min/10⁷ ufc, para una *Candida kefir*. En nuestras condiciones de cultivo, 4 de las cepas (dos *Kluyveromyces marxianus* y dos *Candida kefir*) consumían toda la lactosa del permeado en menos de 48 horas.
2. Con el objeto de comparar sus características medioambientales y para usarlos como fuente para aislar nuevas cepas de levaduras, se analizaron 3 efluentes de queserías de las Comunidades de Madrid y Castilla-La Mancha. El efluente de la quesería más pequeña resultó, con gran diferencia, el más concentrado en materia orgánica, debido a un mayor contenido de suero y al menor gasto de agua empleado en los procedimientos de limpieza manual. En esa misma quesería, aproximadamente la cuarta parte de los microorganismos presentes, eran mohos y levaduras. En contra de lo esperado, las bacterias coliformes fueron en los tres efluentes más abundantes que las lácticas.
3. A partir de esos efluentes, se aislaron un total de 59 cepas de levaduras, 13 de ellas por aislamiento directo y el resto tras adaptación al crecimiento en permeado. 5 de las 59 cepas (2 de aislamiento directo y 3 adaptadas) resultaron capaces de consumir, en nuestras condiciones, toda la lactosa del permeado en menos de 48 horas; una de ellas, en menos de 24 horas. Tampoco en este conjunto de cepas la velocidad de utilización de lactosa se correlacionó con la actividad lactásica. El máximo de actividad lactásica registrada fue de 375 nmoles de ONP/min/10⁷ ufc, para una *Kluyveromyces marxianus*.

De estas 5 cepas, 4 fueron identificadas como *Kluyveromyces marxianus* y la otra, como *Candida intermedia*.

4. Las levaduras, de colección o aisladas de efluentes, en las que se observó mayor velocidad en la utilización de lactosa, no mostraron aptitud para la floculación espontánea, aun habiendo alcanzado la fase estacionaria. Sin embargo, tras 5 horas de reposo, al menos dos terceras partes de las células, decantaban en la mitad inferior del volumen del cultivo; en los cultivos de una de las *K. marxianus*, sedimentan así el 96% de las células. Esto puede abaratar los costes de recuperación.
5. La reducción de la DQO del líquido libre de células, a las 72 horas de cultivo en permeado (matraces) de las cepas seleccionadas, tanto de colección como de efluentes, fue del 25 al 50 %, debido presumiblemente a un metabolismo parcialmente anaerobio, por aireación insuficiente. Las cepas con menor actividad lactásica fueron las que proporcionaron mayor descenso de la DQO.
6. Para mejorar dicha reducción de la DQO, se probó a suplementar los permeados con nitrógeno y fosfato, sin obtenerse diferencias significativas. Sin embargo, al bombear oxígeno en los cultivos (en fermentador), se llegó a una reducción de la DQO del 89 %, con una de las *K. marxianus*, con un rendimiento de 6,6 g de levadura por litro de permeado. El mayor gasto en aireación, podría pues verse compensado por una mayor reducción de la DQO en el líquido de cultivo y por la recuperación de células utilizables como fuente de proteína y lactasa.
7. Las cepas que habían dado mejor resultado, en cuanto a reducción de la DQO, al crecer en permeado, dieron resultados muy inferiores al ser cultivadas en suero dulce, debido presumiblemente al antagonismo ejercido por la microbiota del suero.

8. Para estudiar los efectos de la hidrólisis de la lactosa en la depuración de efluentes, se hidrolizó la lactosa del permeado con una lactasa comercial. A tiempos cortos de incubación, hay indicios de formación de galacto-oligosacáridos, por efecto de la actividad transgalactosidásica de la enzima. Prolongando la incubación, sin embargo, también los oligosacáridos son hidrolizados.
9. Comparando cultivos (en matraz) de 3 días, inoculados con microflora de aguas residuales urbanas, en permeado intacto (control) y con la lactosa hidrolizada, se observó que la hidrólisis no hacía aumentar la concentración de microorganismos totales, ni la proporción (mayoritaria) de bacterias coliformes. Mientras que en el control solo se consumió aproximadamente la mitad de la lactosa al cabo de los 3 días, en el cultivo con lactosa hidrolizada, la glucosa se consumió el primer día y la galactosa entre el segundo y el tercero. Esto sólo supuso una mejora de la reducción de la DQO, por efecto de la hidrólisis de lactosa, de un 27 a un 53 %, según el tipo de agua residual. Este moderado impacto sobre la DQO, pudiera deberse a la acumulación en el medio de productos del metabolismo parcialmente anaerobio y al aporte que hacen las heces a las aguas residuales de una gran proporción de bacterias anaerobias obligadas, que en las condiciones del ensayo, se están lisando y contribuyendo a la DQO y a la nutrición del resto de los microorganismos presentes.
10. En los cultivos con la lactosa hidrolizada comentados en la conclusión anterior, se observaron, sin embargo, diferencias notables en cuanto a algunos compuestos derivados del metabolismo microbiano. Las más marcadas fueron un aumento del 55 % en la concentración en el medio de ácido acético, un 1.800 % en la de etanol y un 28.000 % en la de glicerol. La hidrólisis del permeado con lactasa aislada y el metabolismo parcialmente anaerobio que la aprovecha, podrían reemplazar a gran parte de la fase hidrolítica (microbiana) de los tratamientos convencionales de depuración anaerobia, acelerando el conjunto del proceso.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abril J.R. y J.W. Stull** (1989). Lactose hydrolysis in acid whey with subsequent glucose isomerization. *J. Sci. Food Agric.*, **48**: 511-514.
- Aguilar B.R., M. Montero y H.S. García** (1998). Using fermented cheese whey to reduce acidification time of oaxaca-type cheese. *J. Dairy Sci.*, **80** (Suppl, 1): 102.
- Ahearn D.G., S.P. Meyers y R.A. Nichols** (1968). Extracellular proteinases of yeasts and yeastlike fungi. *Appl. Microbiol.*, **16**: 1370-1374.
- Alexander M.A. y T.W. Jeffries** (1990). Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**: 2-19.
- Alimarket** (1998). *Informe anual ALIMARKET 98. Alimentos perecederos*, vol. 3, pp. 387-434. Ed. Alimarket.
- Al-Mahmood S., P. Giummelly, R. Bonaly, F. Delmotte y M. Monsigny** (1988). *Kluyveromyces bulgaricus* yeast lectins. Isolation of N-acetylglucosamine and galactose-specific lectins: their relation with flocculation. *J. Biol. Chem.*, **263**: 3930-3934.
- Amos P. W.** (1997). Waste water in the food industry: A review of procedure and practice. *Food Sci. Technol. Today*, **11**: 96-104.
- Anderson G.K., B. Kasapgil y O. Ince** (1994). Comparison of porous and non-porous media in upflow anaerobic filters when treating dairy wastewater. *Water Sci. Technol.*, **28**: 1619-1624.
- Angulo L., E. López y C. Lema** (1993). Microflora present in kefir grains in the Galician region (North-West of Spain). *J. Dairy Res.*, **60**: 263-267.
- Anónimo** (1998a). La producción quesera en España supera las 270.000 Tm al año. *ILE*, **231**: 19-24.
- Anónimo** (1998b). Gas ends acid reing. *Dairy Ind. Int.*, **63** (12): 39.
- Anónimo** (1998c). New Tubetest for the dairy sector. *Dairy Ind. Int.*, **63** (12): 47.
- Anónimo** (1997). Especial quesos. *Rev. Esp. Lechería*, **88**: 10-23.
- Anónimo** (1996). Bebidas a base de suero de leche con zumo de frutas, bajas en calorías. *ILE*, **dic**: 49.
- Anónimo** (1988). Producción, análisis y control de calidad de aceites y grasas comestibles. Ed. AMV, Madrid.
- AOAC** (1995). *Official methods of analysis*, vol. 1, (16th ed.). Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

- APHA-AWWA-WEF (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (18th ed.). Ed. American Public Health Association-American Water Works Association-Water Environmental Federation, Washington, D.C.
- APXA (1997). *Prevención de la contaminación por nitratos de purines en el agua*. Ed. Asociación Profesional de Xóvenes Agricultores, Santiago de Compostela.
- Arndt E. A. y R.L. Wehling (1989). Development of hydrolyzed-isomerized syrups from cheese whey ultrafiltration permeate and their utilization in ice cream. *J. Food Sci.*, **54**: 880-884.
- Aronson M. (1952). Transgalactosidation during lactose hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**: 370-373.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En *Lactic acid bacteria*, (2nd ed.), pp 1-72. Salminen S. y A. von Wright (eds.) Ed. Marcel Dekker, New York.
- Bacci Junior M., C.G. Siqueira, S.A. Antoniazzi y J. Ueta (1996). Location of the β -galactosidase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022. *Antonie Leewenhoek*, **69**: 357-361.
- Bachhawat N., L.R. Gowda y S.G. Bhat (1996). Single step method of preparation of detergent-permeabilized *Kluyveromyces fragilis* for lactose hydrolysis. *Process Biochem.*, **31**: 21-25.
- Baeva V.S. (1981). Possibility of producing low-lactose dairy products for infant nutrition by the use of β -galactosidase. *Vopr. Pitan.*, **2**: 63-65.
- Bales S.A. y F.J. Castillo (1979). Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 1201-1205.
- Banat I.M., P. Nigam, D. Singh, R. Marchant y A.P. Mattale (1998). Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part I. Yeasts in general. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**: 809-821.
- Banerjee R. y H. Chen (1995). Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *J. Dairy Sci.*, **78**: 1673-1683.
- Barberis S.E. y J.C. Gentina (1998). Effect of the oxygen level on the lactase production by *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **73**: 71-73.
- Barberis S.E. y R.F. Segovia (1998). Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate into *Kluyveromyces fragilis* culture. *Biotechnol. Tech.*, **11**: 797-799.

- Barbosa M.F.S., D.O. Silva, A.J.R. Pinheiro, W.V. Guimaraes y A.C. Borges (1985).** Production of Beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown in cheese whey. *J. Dairy Sci.*, **68**: 1618-1623.
- Barnett J.A. (1997).** Introduction: A historical survey of the study of yeasts. En *Yeast sugar metabolism*, pp. 1-34. Zimmermann F.K. y K-D. Entian (eds.). Ed. Technomic, Lancaster.
- Barnett J.A. (1992).** Some controls on oligosaccharide utilization by yeasts: The physiological basis of the Kluyver effect. *FEMS Microbiol. Lett.*, **100**: 371-378.
- Barnett J.A. (1981).** The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **39**: 347-404.
- Barnett J.A. y A.P. Sims (1982).** The requirement of oxygen for the active transport of sugars into yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 2303-2312.
- Barnett J.A., Payne R.W. y D. Yarrow (1990a).** *Yeasts: Characteristics and identification*. Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Barnett J.A., Payne R.W. y D. Yarrow (1990b).** *Yeast identification PC Program* (ISBN 0 9513148 4 X).
- Bayer K. (1983).** Trace supplementation of cheese whey for the production of feed yeast. *J. Dairy Sci.*, **66**: 214-220.
- Becerra M. y M.I. González Siso (1996).** Yeast β -galactosidase in solid-state fermentations. *Enzyme Microb. Technol.*, **19**: 39-44.
- Beech I.B., C.C. Gaylarde, J.J. Smith y G.G. Geesey (1991).** Extracellular polysaccharides from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence of mild and stainless steel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**: 65-71.
- Belem M.A.F. y B.H. Lee (1998).** Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **38**: 565-598.
- Belem M.A.F. y B.H. Lee (1997).** Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. *Food Sci. Technol. Int.*, **3**: 437-444.
- Bellal M., J. Boudrant, L. Elfoul y R. Bonay (1995).** Flocculation dispersion in *Kluyveromyces lactis*. *Process Biochem.*, **30**: 641-648.
- Bendeker R.F., H.W. van Dan, J.B. van der Plant y K. Vellenga (1990).** Developments in baker's yeast production. En *Yeast: biotechnology and biocatalysis*, pp. 103-146. Verachtest H. y R. De Mot (eds.). Ed. Marcel Dekker, London.
- Ben-Hassan R.M. y A.E. Ghaly (1995).** Continuous production of single cell protein from cheese whey lactose using *Kluyveromyces fragilis*. *Trans. ASAE.*, **38**: 1121-1127.

- Berg R.D.** (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.*, **4**: 430-435.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (1994). (9th ed.). Holt J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley y S.T. Willians (eds.). Ed. Willians and Wilkins, Baltimore.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Holt J.G. (ed. jefe). Vol. 1 (1984), vol. 2 (1987), vols. 3 y 4 (1989). Ed. Willians and Wilking, Baltimore.
- Besançon X., C. Smet, C. Chaballier, M. Rivemale, J.P. Reverbel, R. Ratomahenina y P. Galzy** (1992). Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**: 9-18.
- Beutler H.O.** (1984). Lactose and D-galactose. UV-method. En *Methods of enzymatic analysis, vol. VI*, (3rd ed.), pp. 104-112. H.U. Bergmeyer (ed.). Ed. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.
- Biermann L. y M.D. Glantz** (1968). Isolation and characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **167**: 373-377.
- Bilinski C.A. y G.G. Stewart** (1990). Yeast proteases and brewing. En *Yeast: biotechnology and biocatalysis*, pp. 147-162. Verachtest H. y R. De Mot (eds.). Ed. Marcel Dekker, London.
- Bisson L.F., D.M. Coons, A.L. Kruckeberg y D.A. Lewis** (1993). Yeast sugar transporters. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **28**: 259-308.
- Bitton G.** (1994). *Wastewater microbiology*. Ed. Wiley-Liss, New York.
- Blier R., G. Laliberté y J. de la Noüe** (1996). Production of the cyanobacterium *Phormidium bohneri* in parallel with epuration of dairy anaerobic effluent. *Process Biochem.*, **31**: 587-593.
- Bódalo A., E. Gómez, J.L. Gómez, J. Bastida, M.F. Máximo y F. Díaz** (1991). A comparison of different methods of β -galactosidase immobilization. *Process Biochem.*, **26**: 349-353.
- Boekhout T. y C.P. Kurtzman** (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. En *Nonconventional yeasts in biotechnology*, pp. 1-81. Wolf K. (ed). Ed. Springer, Berlin.
- Bony M., P. Barre y B. Blondin** (1998). Distribution of the flocculation protein, Flop, at the cell surface during yeast growth: the availability of Flop determines the flocculation level. *Yeast*, **14**: 25-35.

- Borja R., A. Martín, M.M Durán y M. Luque** (1992). Estudio cinético de la depuración anaerobia de las aguas residuales de una industria quesera. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **32**: 19-32.
- Boud C.J.** (1993). *National Collection of Yeast Cultures. Catalogue of cultures 1993*. Ed. Agriculture and Food Research Council, Norwich.
- Boze H., G. Moulin y P. Galzy** (1987). Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*: biochemical characteristics and attempted genetical analysis. *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 15-23.
- Brennan J.G., J.R. Butters, N.D. Cowell y A.E.V. Lilley** (1998). *Las operaciones de la ingeniería de los alimentos*, (3ª ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- British Department of Environment, Health Social Security and Public Health Laboratory Service** (1982). *The bacteriological examination of drinking water supplies report n° 71*. Ed. HMSO, London.
- Brown M.J., C.W. Robbins y L.L. Freeborn** (1998). Combining cottage cheese whey and straw reduces erosion while increasing infiltration in furrow irrigation. *J. Soil Water Conserv.*, **2/4**: 152-156.
- Brun J. Y D.G. Dalgleish** (1997). The effect of heating on the competitive adsorption between caseinate and whey proteins in oil-in-water emulsions. *J. Dairy Sci.*, **80** (Suppl, 1): 124.
- Bryant M.P.** (1979). Microbial methane production-Theoretical aspects. *J. Anim. Sci.*, **48**: 193-201.
- Bull M.A., R. M. Sterritt y J.N. Lester** (1981). Some methods available for treatment of waste water in the dairy industry. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **31**: 579-583.
- Bunn H.F. y R.O. Poyton** (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.*, **76**: 839-885.
- Burgess S.** (1985). Anaerobic treatment of Irish creamery effluents. *Process Biochem.*, **20** (4): vi-vii.
- Burke P.V., D.C. Raitt, L.A. Allen, E.A. Kellogg y R.O. Poyton** (1997). Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase genes in yeast. *J. Biol. Chem.*, **272**: 14705-14712.
- Caballero R., P. Olguín, A. Cruz-Guerrero, F. Gallardo, M. García-Garibay y L-Gómez-Ruíz** (1995). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Res. Int.*, **28**: 37-41.

- Cadieux S.O., Y. Kakuda, O.P. Ward y M.W. Griffiths** (1998). Bacterial production of ω -3 fatty acids in whey. *Milchwissenschaft*, **53** (10): 547-551.
- Calleja G.B.** (1987). Cell aggregation. En *The yeast*, vol. 2., (2nd ed.), pp. 165-238. A.H. Rose y J.S. Harrison (eds.). Ed. Academic Press, London.
- Carballo J.** (1994). Tratamiento de vertidos de la industria láctea. *Rev. Esp. Lechería*, mayo: 22-33.
- Carreras N.** (1998). Principales retos tecnológicos en el tratamiento de residuos sólidos. En *Jornadas de Innovación tecnológica en el sector medioambiental: Tecnologías para el tratamiento de residuos sólidos*. Madrid.
- Cartwright C.P., A.H. Rose, J. Calderbank y M.H.J. Keenan** (1989). Solute transport. En *The yeast. Metabolism and physiology of yeasts*, vol. 3, (2nd ed.), pp. 5-56. A.H. Rose y J.S. Harrison (eds.), Ed. Academic Press, London.
- Carvalho-Silva M. y I. Spencer-Martins** (1990). Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Leewenhoek*, **57**: 77-81.
- Casas I.A., F.W. Edens y W.J. Dobrogosz** (1998). *Lactobacillus reuteri*: an effective probiotic for poultry and other animals. En *Lactic acid bacteria*, (2nd ed.), pp 475-518. Salminen S. y A. von Wright (eds.). Ed. Marcel Dekker, New York.
- Castillo F.J.** (1990). Lactose metabolism by yeasts. En *Yeast: biotechnology and biocatalysis*, pp. 297-320. Verachtest H. y R. De Mot (eds.). Ed. Marcel Dekker, London.
- Castillo F.J. y B. Moreno** (1983). Properties of lactase produced by *Candida pseudotropicalis*. *J. Dairy Sci.*, **66**: 1616-1621.
- Castillo F.J. y S.B. De Sánchez** (1978). Studies on the growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey for the production of yeast protein. *Acta Cient. Venez.*, **29**: 113-118.
- Castillo M., M.J. Jordán, A. Abellán, J. Laencina y M.B. López** (1996). Tecnología de aprovechamiento del lactosuero. *Rev. Esp. Lechería*, marzo: 26-30.
- Castillo F.J., S.B. De Sánchez y J.A. Gonçalves** (1979). Nitrogen supplementation of milk whey for the growth of *Kluyveromyces fragilis*. *Acta Cient. Venez.*, **30**: 588-590.
- Castrillo J.I. y U.O. Ugalde** (1993). Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**: 386-393.
- Cavaille D. y D. Combes** (1995). Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **22**: 55-64.
- Ciriacy M. y E. Reifemberger** (1997). Hexose transport. En *Yeast sugar metabolism*, pp. 45-66. Zimmermann F.K. y K-D. Entian (eds.). Ed. Technomic, Lancaster

- Civantos L., R. Contreras y R. Grana** (1992). *Obtención del aceite de oliva virgen*. Ed. Agrícola Española, Madrid.
- Clare R.** (1998). The benefits of CMP. *Dairy Ind. Int.*, **63** (12): 29,31.
- Cocero M.J. y L. Calvo** (1995). Planta piloto-laboratorio de extracción con CO₂ supercrítico para la obtención de aceite de semilla. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **3/95**: 67-72.
- Código Alimentario Español** (1992). *Código alimentario español*, (2ª ed.). Ed. Tecnos, Madrid.
- Coelho E.B.B., D.T. Coelho, A.J.R. Pinheiro, J.B.P. Chaves y A. S. Pereira** (1982). Use of beta-D-galactosidase to control crystallization in sweetened, partially caramelized milk. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, **37** (221): 7-11.
- Cohen A., J.H. Thiele y J.G. Zeikus** (1994). Pilot-scale anaerobic treatment of cheese whey by the substrate shuttle process. *Water Sci. Technol.*, **30**: 433-442.
- Cohen A., J.M. van Gemert, R.J. Zoetemeyer y A.M. Breure** (1984). Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewaters. *Process Biochem.*, **19**: 228-232.
- Comegna E.** (1996). Un mercato da conquistare. *Latte*, **21** (12): 30-40.
- Compagno C., D. Porro, C. Smeraldi y B.M. Ranzi** (1995). Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**: 822-825.
- Córdoba P.R., F. Sanchez Riera y F. Siñeriz** (1984). Treatment of dairy industry wastewater with an anaerobic filter. *Biotechnol. Lett.*, **6**: 753-758.
- Costabeber I., P.J. Ibáñez, M.C. Gallego, S. Serrano, R. Angulo y M. Jodral** (1998). Métodos de identificación de levaduras en alimentos. *Alimentaria*, **289**: 89-97.
- Coton G.** (1980). New uses for whey permeates. *Food Eng.*, **52**: 132.
- Coughlin R.W., M. Charles, B.R. Allen, E. K. Paruchuri y F. X. Hasselberger** (1974). Increasing economic value of whey wastewater using immobilized lactase. *AIChE Symp. Ser.*, **70** (144): 199-206.
- Crippen K.L. y I.J. Leon** (1984). Direct-acid-set Cottage cheese whey as a base for a shelf-stable athletic-type drink. *J. Food Prot.*, **47**: 53-57.
- Cristiani-Urbina E., N. Ruíz-Ordaz y J. Galíndez-Mayer** (1997). Differences in the growth kinetics behaviour of *Torulopsis cremoris* in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **26**: 189-194.

- Cubells M.X., A. Narbad, A.T. Carter y M. Stratford (1996). Flocculation of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*): an essential role for peptone. *Yeast*, **12**: 415-423.
- Chambers J.V. y A. Ferretti (1979). Industrial application of whey/lactose. *J. Dairy Sci.*, **62**: 112-116.
- Champluvier B., B. Kamp y P.G. Rouxhet (1988). Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, **10**: 611-617.
- Chartrain M. y J.G. Zeikus (1986a). Microbial ecophysiology of whey biomethanation: Intermediary metabolism of lactose degradation in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 180-187.
- Chartrain M. y J.G. Zeikus (1986b). Microbial ecophysiology of whey biomethanation: Characterization of bacterial trophic populations and prevalent species in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 188-196.
- Chartrain M., L. Bhatnagar y J.G. Zeikus (1987). Microbial ecophysiology of whey biomethanation: comparison of carbon transformation parameters, species composition, and starter culture performance in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1147-1156.
- Chianese L., S. Caira, P. Ferranti, P. Laczka, A. Malorni, G. Mucchetti, G. Garro y F. Addeo (1997). The oligopeptides of sweet and acid cheese whey. *Lait*, **77**: 699-715.
- Chiu C.P. y F. V. Kosikowski (1985). Hydrolyzed lactose syrup from concentrated sweet whey permeates. *J. Dairy Sci.*, **68**: 16-22.
- D'Amore T., G. Celotto, I. Russell y G.G. Stewart (1989). Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 411-416.
- Dahlqvist A. (1984). β -galactosidase (lactase). En *Methods of enzymatic analysis*, vol. IV, (3rd ed.), pp. 227-230. H.U. Bergmeyer (ed.). Ed. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.
- Dalev P.G. (1994). Utilization of waste whey as a protein source for production of iron proteinate: an antianemic preparation. *Bioresource Technol.*, **48**: 75-77.
- Davies A. (1964). Lactose utilization and hydrolysis in *Saccharomyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.*, **37**: 81-98.
- Davies A. (1956). Some factors affecting lactase formation and activity in *Saccharomyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.*, **14**: 425-439.

- De Felice B. y D. Scioli** (1994). Use of crude whey by *Kluveromyces marxianus* and by *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution of effluents. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, **44**: 65-92.
- De Felice B. y D. Scioli** (1992). Influenza del cloruro ferrico suella crescita di *Kluveromyces marxianus* in siero di latte. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, **42**: 87-92.
- De Groote J., L. Vroegop y M. Brailsford** (1995). A proactive tool for the control of yeast spoilage in fermented milk products. *Microbiol. Eur.*, **3** (5): 24-27.
- De Haast J., T.J. Britz, J. C. Novello y E. W. Verwey** (1985). Anaerobic digestion of deproteinized cheese whey. *J. Dairy Res.*, **52**: 457-467.
- De Rafols W.** (1964) *Aprovechamiento industrial de los productos agrícolas*. Ed. Salvat, Barcelona.
- De Sánchez S.B. y F.J. Castillo** (1980). Effect of pH on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on deproteinized whey. *Acta. Cient. Venez.*, **31**: 24-26.
- De Vuyst L. y E.J. Vandamme** (1994). Antimicrobial potencial of lactic acid bacteria. En *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, pp. 91-142. De Vuyst L. y E.J. Vandamme (eds.). Ed. Chapman and Hall, London.
- De Wit J.N.** (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy. Sci.*, **81**: 597-608.
- Deák T. y L.R. Beuchat** (1987). Identification of foodborne yeasts. *J. Food Protect.*, **50**: 243-264.
- Decleire M., W. De Cat y N. Van Huynh** (1987). Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining *in situ* β -galactosidase activity. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**: 300-302.
- Deken R.H.** (1966a). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.*, **44**: 149-156.
- Deken R.H.** (1966b). The Crabtree effect and its relation to the petite mutation. *J. Gen. Microbiol.*, **44**: 157-165.
- Devoyod J.J.** (1970). Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. II. Action de *Penicillium roqueforti* sur l'évolution de la flore microbienne. *Lait*, **499-500**: 644-653.
- Di Giovacchio L.** (1998). Recolección de las aceitunas y extracción del aceite de oliva. En *Química y tecnología del aceite de oliva*, pp. 25-26. Boskou D. (ed.). Ed. AMV Mundi prensa, Madrid.
- Dicker R.** (1982). Whey hydrolysis a "sweet" breakthrough. *Dairy Ind. Int.*, **47**(4): 19-21.

- Dickson R.C. y K. Barr (1983). Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **154**: 1245-1251.
- Dickson R.C. y J.S. Markin (1980). Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **142**: 777-785.
- Domínguez H., J. Sineiro, M.J. Núñez y J.M. Lema (1995). Incorporación de un tratamiento enzimático para mejorar la extractabilidad del aceite de semillas en distintos procesos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **3/95**: 59-66
- Donkin M.J. (1997). Bulking in aerobic biological systems treating dairy processing wastewater. *Int. J. Dairy Technol.*, **50** (2): 67-72.
- Dorokhov A.N., I.F. Chchelokova, V.A. Kuydra, N.A. Tsirik y T.N. Minyailenko (1985). Use of bacterial β -galactosidase in the production of cookies. *Khelebopek. Konditer. Prom-st.*, **10**: 43-44.
- Drobot V.I. y V.A. Kudrya (1981). Effect of the enzymic hydrolysis of milk whey lactose on bread quality. *Pishch. Prom-st.*, **4**: 33-35.
- Droste R.L. (1997). *Theory and practice of water and wastewater treatment*. Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Earle R.L. (1988). *Ingeniería de los alimentos*, (2ª ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- Eikelboon D.H. y H.J.J. van Buijsen (1981). *Microscopic sludge investigation*. Report A94a. TNO Research Institute, The Netherlands.
- Elkin J.D. (1984). Dairy effluent disposal. *Dairy Ind. Int.*, **49** (4): 29, 33, 35.
- El-Samragy Y.A. y R.R. Zall (1988). The influence of sodium chloride on the activity of yeast in the production of single cell protein in whey permeate. *J. Dairy Sci.*, **71**: 1135-1140.
- El-Samragy Y.A., J.H. Chen y R.R. Zall (1988). Amino acid and mineral profile of yeast biomass produced from fermentation of Cheedar whey permeate. *Process Biochem.*, **23** (1): 28-30.
- Engelen A.J. y P.H.G. Randsdorp (1999). Determination of neutral lactase activity in industrial enzyme preparations by a colorimetric enzymatic method: collaborative study. *J. AOAC Int.* **82** (1): 112-118.
- Entian K-D. (1997). Sugar phosphorylation in yeast. En *Yeast sugar metabolism*, pp. 67-80. Zimmermann F.K. y K-D. Entian (eds.). Ed. Technomic, Lancaster.

- Ephrussi B., H. Hottinguer y A.M. Chimenes (1949).** Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur*, **76**: 351 (citado por Deken, 1966).
- Espigares M., F. S. Izquierdo, J. M. Carretero y R. G. Vargas (1997).** Aguas residuales y efluentes depurados de una industria láctea. *Tecnología del Agua*, **162**: 46-52.
- Esser K. y U. Kües (1983).** Flocculation and its implication for biotechnology. *Process Biochem.*, **18**: 21-22.
- Fabre C.E., V.J. Duviau, P-J- Blanc y G. Goma (1995).** Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, **17**: 1207-1212.
- FAO (1998).** *Boletín Trimestral FAO de Estadística*, vol 11 (1/2): 103-107.
- FAO (1996).** *Boletín Trimestral FAO de Estadística*, vol 9 (1/2): 40-43.
- Farahat S.M., A.M. Rabie, A.A. Abdel Baky, A.A. El-Neshawy y S. Mobasher (1985).** β -galactosidase in the acceleration of Ras cheese ripening. *Nahrung*, **29**: 247-254.
- FDA (1984).** Lactase from *Kluyveromyces lactis*., GRAS affirmed, 21 Code of Federal Regulations (CFR). 184.1388.49, Federal Register 47 387, December, 4.
- Fenema O.R. (1996).** *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- FENIL (1998).** Informe sobre la producción y comercialización de derivados del lactosuero en España. Ed. Federación Nacional de Industrias Lácteas.
- Fenton D.M. (1982).** Solvent treatment for β -D-galactosidase release from yeast cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **4**: 229-232.
- Fernandes P.A., M. Sousa y P. Moradas-Ferreira (1993).** Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. *Yeast*, **9**: 859-866.
- Fiechter A., G.F. Fuhrmann y O. Käppeli (1981).** Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microb. Physiol.*, **22**: 123-183.
- Fiestas J.A. y R. Borja Padilla (1991).** Tratamiento de alpechines mediante procesos biológicos, pp. 65-82. Actas de la *Reunión Internacional sobre Tratamiento de Alpechines*, Córdoba. Ed. Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias, Sevilla.
- Fiestas Ros J.A., R. Borja Padilla, M.M. Durán Barrantes y M. Luque González (1992).** Nuevas perspectivas en la depuración de aguas residuales de industrias agroalimentarias. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **6/92**: 123-126.

- Fischer E. (1894). *Ver. Chem. Gesellsch*, **27**: 3479-3483. (Citado por Rouwenhorst y col, 1989).
- Fleet G.H. (1991). Cell walls. En *The yeast. vol. 4, Yeast organelles*, (2nd ed.), pp. 200-264. A.H. Rose y J.S. Harrison (eds.). Ed. Academic Press, London.
- Fleet G.H. (1990). A review: Yeasts in dairy products. *J. Appl. Microbiol*, **68**: 199-211.
- Fleet G.H. y M.A. Mian (1987). The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Int. J. Food Microbiol*, **4**: 145-155.
- Flores M.V., C.E. Voget y R.J.J. Ertola (1994). Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 340-346.
- Fonseca A., I. Spencer-Martins y N. van Uden (1991). Transport of lactic acid in *Kluyveromyces marxianus*: evidence for a monocarboxylate uniport. *Yeast*, **7**: 775-780.
- Forsman E-S., M. Heikonen, L. Kiviniemi, M. Kreula y P. Linko. (1979). Kinetic investigations of the hydrolysis of milk lactose with soluble *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Milchwissenschaft*, **34**: 618-621.
- Fournier D., J.P. Schwitzguébel y P. Péringer (1993). Effect of different heterogeneous inocula in acidogenic fermentation of whey permeate. *Biotechnol. Lett.*, **15**: 627-632.
- Frazier W.C. y D.C. Westhoff (1993). *Microbiología de los alimentos*, (4^a ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- Frengova G., E. Simova, K. Pavlova y D. Beshkova (1994). Formation of carotenoids by *Rhodothorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**: 888-894.
- Fullana P. y R. Puig (1997). *Análisis del Ciclo de Vida*. Ed. Rubes, Barcelona.
- Fung D.Y.C. y C. Liang (1990). Critical review of isolation, detection, and identification of yeasts from meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **29**: 341-379.
- Fynn G. Y M. Syafila (1990). Hydrogen regulation of acetogenesis from glucose by freely suspended and immobilised acidogenic cells in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* **12**: 621-626.
- Gabás J.I. (1998). La eliminación de residuos de origen animal. *Carnica 2000*, 169-170: 106-107.
- Galarraga A. y A.M. Rocandio (1997). Leches bajas en lactosa. Utilidad dietético-sanitaria e indicaciones. *Alimentaria*, **285**: 51-59.
- Gancedo C. y R. Serrano (1989). Energy-yielding metabolism. En *The yeast. Metabolism and physiology of yeasts*, vol. 3, (2nd ed.), pp. 205-260. A.H. Rose y J.S. Harrison (eds.), Ed. Academic Press, London.

- García Alvarez P. y J.A. Cortacans Torre** (1986). Estación depuradora de Valdebebas. *E. y S. Municipales*, **8**: 99-110.
- García Grande F.** (1986). Estación depuradora China. *E. y S. Municipales*, **8**: 41-51.
- García Rodríguez A.** (1991). Eliminación y aprovechamiento agrícola del alpechín, pp. 105-124. *Actas de la Reunión Internacional sobre Tratamiento de Alpechines*, Córdoba. Ed. Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias, Sevilla.
- Gekas V. y M. López-Leiva** (1985). Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochem.*, **20**: 2-12.
- Ghaly A.E.** (1996). A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stage reactor. *Bioresource Technol.*, **58**: 61-72.
- Ghaly A.E. y A.A. El-Taweel** (1995a). Effect of micro-aeration on the growth of *Candida pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey. *Bioresource Technol.*, **52**: 203-217.
- Ghaly A.E. y A.A. El-Taweel** (1995b). Effect of nutrient supplements addition on ethanol production from cheese whey using *Candida pseudotropicalis* under batch condition. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **53**: 107-131.
- Ghaly A.E. y R.K. Singh** (1989). Pollution potencial reduction of cheese whey through yeast fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **22**: 181-203.
- Ghaly A. E., R.M. Ben-Hassan, M.H. Mansour y M.A. Nassar** (1993). Modelling batch production of single cell protein from cheese whey. III: Oxygen utilization. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **43**: 25-36.
- Gholson J.M. y R.H. Gough** (1980). Yeasts that utilize lactose in sweet whey. *Louisiana Agriculture*, **23**: 19,21.
- Gilliland S.E.** (1998). Fermented milks and probiotics. En *Applied dairy microbiology*, pp. 195-212. Marth E.H. y J.L. Steele (eds.). Ed. Marcell and Dekker, New York.
- Gilliland S.E.** (1979). Measuring chemical oxygen demand of Cottage cheese whey cultured with *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.*, **62**: 882-887.
- Giraffa G., M. Gatti, E. Fornasari, E. Forni, D. Carminati y E. Neviani** (1992). Composizione innesto. Il sieroinnesto per Provolone: specie dominanti e loro attività. *Latte*, **17** (11): 1057-1058.
- Glass L. y T.I. Hedrick** (1977a). Nutritional composition of sweet- and acid- type dry wheys. I. Major factors including amino acids. *J. Dairy Sci.*, **60**: 185-189.

- Glass L. y T.I. Hedrick (1977b). Nutritional composition of sweet- and acid- type dry wheys. II. Vitamin, mineral and calorie contents. *J. Dairy Sci.*, **60**: 190-196.
- Gogoi B., M. Khan, S.H. Alavi y S.S.H. Rizvi (1998). Novel application of whey proteins to stabilize micro-cellular structure of starch-based foods by supercritical fluid extrusion. *J. Dairy Sci.*, **81** (Suppl, 1): 15.
- Gómez J. y G. Goma (1986). Effect of different inoculum levels of heterogeneous mixed culture in acidogenic fermentation. *Biotechnol. Lett.*, **8**: 833-836.
- Gonçalves J.A., F.J. Castillo (1982). Partial purification and characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Sci.*, **65**: 2088-2094.
- González Siso M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technol.*, **57**: 1-11.
- González Siso M.I., E. Ramil, M.E. Cerdán y M.A. Freire-Picos (1996). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb. Technol.*, **18**: 585-591.
- González F., J.I. Castrillo y U.O. Ugalde (1993). Aprovechamiento del lactosuero para la producción de proteína unicelular (SCP). *ILE*, mayo: 73-78.
- González J.A., A. García y F. Romero (1982). Características del vertido de una central lechera. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **22**: 501-510.
- Gottschalk G. (1986). *Bacterial metabolism*, (2nd ed.). Ed. Springer, Berlin.
- Groenewold J.C. (1981). Dairy wastes. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **53**: 795-797.
- Guerrero L., F. Omil, R. Méndez y J.M. Lema (1997). Tratamiento y revalorización de las aguas residuales de la fabricación de harina de pescado. *RETEMA*, septiembre/octubre: 33-43.
- Guiraud J.P. y P. Galzy (1990). Inulin conversion by yeasts. En *Yeast: biotechnology and biocatalysis*, pp. 255-296. Verachtest H. y R. De Mot (eds.). Ed. Marcel Dekker, London.
- Guiraud J. y P. Galzy (1976). Rôle d'une levure dans un accident de fabrication chez des fromages à pâte fraîche. *Lait*, **558**: 495-497.
- Hack C.J. y R. Marchant (1998). Ethanol adaptation in a thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **20**: 227-231.
- Haddadin M.S., S.R. Al-muhirat, N. Batayneh y R.K. Robinson (1996). Production of acetic and propionic acids from labneh whey by fermentation with propionibacteria. *J. Soc. Dairy Technol.*, **49**: 79-81.

- Hamdi M.** (1996). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochem.*, **31**: 105-110.
- Harden T.J.** (1996). The reduction of BOD and production of biomass from acid whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Food Aust.*, **48**: 456-457.
- Hargrove R.E., F.E. McDonough, D.E. LaCroix y T.A. Alford** (1976). Production and properties of deproteinized whey powders. *J. Dairy Sci.*, **59**: 25-33.
- Harju M., M. Heikonen y M. Kreula** (1976). Nutrient supplementation of swiss cheese whey for the production of feed yeast. *Milchwissenschaft*, **31**: 530-534.
- Harper W.J.** (1992). Lactose and lactose derivatives. En *Whey and lactose processing*, pp. 317-360. Zadow J.G. (ed). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Harris J.O.** (1959). Possible mechanism of yeast flocculation. *J. Inst. Brew.*, **65**: 5-11.
- Hartemak R., M.J.R. Nowt y F.M. Rombouts** (1994). Oligosacchariden bifidogene factoren. *Voedingsmiddelentechnologie*, **20**: 27-29.
- Henning D.R.** (1998). Fermented by-products. En *Applied dairy microbiology*, pp. 251-262. Marth E.H. y J.L. Steele (eds.), Ed. Marcell and Dekker, New York.
- Henschke P.A. y A.H. Rose** (1991). Plasma membranes. En *The yeast. Yeast organelles*, vol. 4, (2nd ed.), pp. 297-340. A.H. Rose y J.S. Harrison (eds.). Ed. Academic Press, London.
- Henze M.** (1997). Characterization of wastewaters and sludges. En *Wastewater treatment: biological and chemical processes*, (2nd ed.), pp. 37-53. Henze M., P. Harremoës, J. la cour Jansen y E. Arvin (eds.). Ed. Springer, Berlin.
- Hernández Suárez M.** (1994). Digestión anaeróbica como sistema de tratamiento de efluentes para la recuperación de energía y reducción de los costes de tratamiento. *Rev. Esp. Lechería*, **ene**: 23-27.
- Hewitt G.M. y W.D. GrootWassink** (1984). Simultaneous production of inulase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**: 263-270.
- Hobman P.G.** (1984). Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinized milk serum. *J. Dairy Sci.*, **67**: 2630-2653.
- Hobman P.G.** (1992). Ultrafiltration and manufacture of whey protein concentrates. En *Whey and lactose processing*, pp. 195-230. Zadow J.G. (ed). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Hohmann S.** (1997). Piruvate decarboxilases. En *Yeast sugar metabolism*, pp. 187-212. Zimmermann F.K. y K-D. Entian (eds.). Ed. Technomic, Lancaster.

- Holsinger V.H., L.P. Posati y E.D. DeVilbiss (1974). Whey beverages: A review. *J. Dairy Sci.*, **57**: 849-859.
- Hoppe G.K. y J.J. Higgins (1992). Demineralization. En *Whey and lactose processing*, pp. 91-132. Zadow J.G. (ed). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Hörtner H., G. Ammerer, E. Hartter, B. Hamilton, J. Rytka, T. Bilinski y H. Ruis (1982). Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome *c* in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *Eur. J. Biochem.*, **128**: 179-184.
- Horton B.S. (1987) Anaerobic fermentation and ultra-osmosis. *Bull. IDF*, **212**: 77-83.
- Horton B.S. (1995). Commercial utilization of minor milk components in the health and food industries. *J. Dairy Sci.*, **78**: 2548-2589.
- Hoseny R.C. (1994). *Principles of cereal: science and technology*, (2nd ed.). Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul.
- Hough J.S. (1990). *Bioteología de la cerveza y de la malta*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Hu M., J-Y. Hwang, M.J. Kurth, Y-L. Hsieh, C.F. Shoemaker y J.M. Krochta (1997). Polyurethane rigid foam derived from reduced sweet whey permeate. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 4156-4161.
- Huang Y. y S-T. Yang (1998). Acetate production from whey lactose using co-immobilized cells of homolactic and homoacetic bacteria in a fibrous-bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **60**: 498-507.
- Hussain T., O. Salhi, J. Lematre, C. Charpentier y R. Conaly (1986). Comparative studies of flocculation and deflocculation of *Saccharomyces uvarum* and *Kluyveromyces bulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 269-273.
- Hussein L., S. Elsayed y S. Foda (1989) Reduction of lactose in milk by purified lactase produced by *Kluyveromyces lactis*. *J. Food Prot.*, **52**: 30-34.
- IDF (1997). Removal of fats, oils and grease in the pretreatment of dairy wastewaters. *Bull IDF*, **327**: 3-15.
- IDF (1994). Environmental influence of chemicals used in the dairy industry which can enter dairy wastewater. *Bull IDF*, **288**: 17-31.
- IDF (1990). Anaerobic treatment of dairy effluents. *Bull. IDF*, **252**: 3-23.
- IDF (1984). Balance Tanks for dairy effluent treatment plants. *Bull IDF*, **174**: 3-11.
- Iglesias J. (1994). Incidencia de la Directiva 91/271/CEE en el tratamiento de las aguas residuales del sector de industrialización de la leche. *Rev. Esp. Lechería*, **marzo**: 25-31.

- Ince O.** (1998). Performance of two-phase anaerobic digestion system when treating dairy wastewater. *Water Res.*, **32**: 2707-2713.
- Inchaurredo V.A., O.M. Yantorno y C.E. Voget** (1994). Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochem.*, **29**: 47-54.
- Itoh T., M. Suzuki y S. Adachi** (1982). Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 899-904.
- Jakobsen M. y J. Narvhus** (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy. J.*, **6**: 755-768.
- Jarvis B.** (1973). Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of molds and yeasts in foods. *J. Appl. Bacteriol.*, **36**: 723-727.
- Jay J.M.** (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 525-532.
- Jelen P.** (1992). Whey cheeses and beverages. En *Whey and lactose processing*, pp. 157-194. Zadow J.G. (ed). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Jelen P.** (1983). Reprocessing of whey and other dairy wastes for use as food ingredients. *Food Technol.*, **37** (2): 81-84.
- Jenq W., R.A. Speckman, R.E. Crang y M.P. Steinberg** (1989). Enhanced conversion of lactose to glycerol by *Kluyveromyces fragilis* utilizing whey permeate as a substrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 573-578.
- Jiang J.** (1995). Volatile metabolites produced by *Kluyveromyces lactis* and their changes during fermentation. *Process Biochem.*, **30**: 635-640.
- Jiménez C.B. y V.H. Landa** (1998). Physico-chemical and bacteriological characterization of wastewater from Mexico city. *Water Sci. Technol.*, **37**: 1-8.
- Jiménez R., M. Acosta y C. Díaz** (1998). Obtención y utilización de autolizado de levaduras. *Alimentaria*, **289**: 99-103.
- Johns M.R.** (1995). Developments in wastewater treatment in the meat processing industry: a review. *Bioresource Technol.*, **54**: 203-216.
- Johnson M.E.** (1998). Cheese products. En *Applied dairy microbiology*, pp. 213-250. Marth E.H. y J.L. Steele (eds.). Ed. Marcell and Dekker, New York.
- Joshi M.S., L.R. Gowda, L.C. Katwa y S.G. Bhat** (1989). Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 439-443.

- Ju Z.Y. y A. Kilara** (1998). Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. *J. Food Sci.*, **63**: 288-291.
- Juengst F.W.** (1979). Use of total whey constituents. Animal feed. *J. Dairy Sci.*, **62**: 106-111.
- Kailasapathy K. y D. Supriadi** (1998). Effect of partially replacing skim milk powder whey protein concentrate on the sensory qualities of lactose hydrolyzed acidophilus yogurt. *Milchwissenschaft*, **53** (7): 385-389.
- Kallel-Mhiri H., C. Valance, J.M. Engasser y A. Miclo** (1994). Yeast continuous mixed cultures on whey permeate and hydrolyzed starch. *Process Biochem.*, **29**: 381-386.
- Kalogridou-Vassiliadou D., N. Tzanetakis y E. Litopoulou-Tzanetaki** (1994). Microbiological and physicochemical characteristics of "Anthotyro", a Greek traditional whey cheese. *Food Microbiol.*, **11**: 15-19.
- Kalyuzhnyi S.V., E. P. Martinez y J.R. Martinez** (1997). Anaerobic treatment of high-strength cheese-whey wastewaters in laboratory and pilot UASB-reactors. *Bioresource Technol.*, **60**: 59-65.
- Karam J. y J.A. Nicell** (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **69**: 141-153.
- Kasapgil B., G.K. Anderson y O. Ince** (1994). An investigation into the pre-treatment of dairy wastewater prior to aerobic biological treatment. *Water Sci. Technol.*, **29** (9): 205-212.
- Kato I. y H. Tanaka** (1998). Influence of CO₂ ventilation on microbial cultivation in shake-flasks. *Biotechnol. Tech.*, **12**: 325-328.
- Kato M.T., J.A. Field, R. Kleerebezem y G. Lettinga** (1994). Treatment of low strength soluble wastewater in UASB reactors. *J. Ferment. Bioeng.*, **77**: 679-686.
- Keshavarz E. y S. Nakai** (1984). Utilization of resin-neutralized whey in making cake and bread. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **17**: 107-111.
- Kiers J., A-M. Zeeman, M. Luttik, C. Thiele, J.I. Castrillo, H.Y. Steensma, J.P. van Dijken y J.T. Pronk** (1998). Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast*, **14**: 459-469.
- Kilara A. y M.T. Patel** (1992). Whey and lactose fermentation. En *Whey and lactose processing*, pp. 409-448. Zadow J.G. (ed). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Kim H. y E.C.Y. Li-Chan** (1998). Separation of Immunoglobulin G from Cheddar cheese whey by avidin-biotinylated IG Y chromatography. *J. Food. Sci.*, **63**: 429-434.

- Kim S-J. Y Z. Ustunol** (1998). Microestructure of whey protein-based edible films containing candelilla wax and water fat. *J. Dairy Sci.*, **81** (Suppl, 1): 21.
- King V.A-E. y R.R. Zall** (1983). Ethanol fermentation of whey using calcium alginate entrapped yeasts. *Process Biochem.*, **18**: 17-20.
- Kiritsakis A.K.** (1992). *El aceite de oliva*. Ed. Madrid Vicente, Madrid.
- Kisaalita W.S., K.V. Lo y K.L. Pinder** (1989). Influence of dilution rate on the acidogenic phase products distribution during two-phase lactose anaerobiosis. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**: 1235-1250.
- Kisaalita W.S., K.L. Pinder y K.V.Lo** (1987). Acidogenic fermentation of lactose. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 88-95.
- Kitamoto H.K. y T. Nakahara** (1994). Isolation of an L-Methionine-enriched mutant of *Kluyveromyces lactis* grown on whey permeate. *Process Biochem.*, **29**: 127-131.
- Knorr D.** (1984). Use of chitinons polymers in food. *Food Technol.*, **38**: 85-97.
- Ko Y.T. y J.R. Chipley** (1983). Microbial production of lysine and threonine from whey permeate. *Appl. Envirom. Microbiol.*, **45**: 610-615.
- Kocková-Kratochvílová A.** (1990). *Yeast and yeast-like organisms*. Ed. VCH, New York.
- Kolarski R. y G. Nyhuis** (1996). The use os sequencing batch reactor technology for treatment of high-strength dairy processin waste. *Proceedings of the Ind. Waste Conference*, vol. **50th** : 485-494.
- Kosaric N.** (1996). Ethanol-Potential source of energy and chemical products. En *Biotechnology*, (2nd ed.), pp. 123-203. Rehmand H-J y G. Reed. (eds.). vol 6. *Products of primary metabolism*. Roehr M. (ed). Ed. VCH, Weinheim.
- Kosminskii G.I., G.S. Sorokina, T.A. Cheremnova y V.V. Dorokhov** (1991). Optimal conditions for the hydrolysis of whey lactose to be used in brewing. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Teknol.*, **1-3**: 92-94.
- Kotzekidou P.** (1997). Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiol*, **14**: 609-616.
- Kreger-van Rij** (1984a). General classification of the yeasts. En *The Yeasts. A taxonomic study*, (3rd ed.), pp. 1-43. Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.). Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kreger-van Rij** (1984b). Genus 7. *Debaryomyces* Lodder et Kreger-van Rij nom.cons. En *The Yeasts. A taxonomic study*, (3rd ed.), pp. 130-145. Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.). Ed. Elsevier, Amsterdam.

- Kumar J.V., A. Shahbazi y R. Mathew** (1998). Bioconversion of solid food wastes to ethanol. *Analyst.*, **123**: 497-502.
- Kwak H.S. y I.J. Jeon** (1986). Effect of various conditions on the formation of oligosaccharide in milk treated with β -galactosidase. *J. Dairy Sci.*, **69**: 2785-2790.
- Labuschagne J.H. y J.A. Nieuwoudt** (1978). Shortening of Cheddar cheese manufacturing by (1) elimination of the cheddaring process and (2) the addition of β -galactosidase. *S. Afr. J. Dairy Technol.*, **10** (2): 77-81.
- Lachance M-A** (1993). *Kluyveromyces*: systematics since 1970. *Antonie Leeuwenhoek*, **63**: 95-104.
- Large P.J.** (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast*, **2**: 1-34.
- Le Hénaff S., S.L. Turgeon, C. Sánchez y P. Paquin** (1997). Study of the formation of whey protein-xanthan complexes. *J. Dairy Sci.*, **80** (Suppl, 1): 103.
- Levy M.I. y J.U. McGregor** (1998). Effect of fat content and whey protein fortification on milk frothing properties. *J. Dairy Sci.*, **81** (Suppl, 1): 23.
- Lin A.Y. y T.A. Nickerson** (1976). Acid hydrolysis of lactose in whey versus aqueous solutions. *J. Dairy Sci.*, **60**: 33-39.
- Lodder J.** (1971). *The yeasts. A taxonomic study*, (2nd ed.). Ed. North-Holland, Amsterdam.
- López Mateos F. y J.F. Mastral Lajusticia** (1986). Depuración de las aguas residuales de centrales lecheras (II). Sistemas de lodos activos con oxígeno. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **10/86**: 53-68.
- López Mateos F., M. Gracia Ortubia y J.F. Mastral Lajusticia** (1986). Depuración de las aguas residuales de centrales lecheras (I). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **7/86**: 81-90.
- López-Leiva M.H. y M. Guzmán** (1995). Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochem.*, **30**: 757-762.
- López-Leiva M. y V. Gekas** (1988). Application of immobilized enzymes in food processing. En *Developments in food microbiology*, vol 4, pp. 121-147. Robinson R.K. (ed.). Ed. Elsevier.
- Lowry O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr y R.J. Randall** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Luquet F.M.** (1993). *Leche y productos lácteos*, vol. 2. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Macedo A.C., F.X. Malcata y T.A. Hogg** (1995). Microbial profile in Serra ewes' cheese ripening. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**: 1-11.

- MacLeod F.A., S.R. Guiot y J.W. Costerton** (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1598-1607.
- Madrid A.** (1999). Aprovechamiento de los subproductos cárnicos. Ed. AMV, Madrid.
- Madrid A.** (1994). *Nuevo manual de tecnología quesera*. Ed. AMV Ediciones y Mundi-Prensa Libros, Madrid.
- Mafart P. y E. Béliard** (1994). *Ingeniería industrial alimentaria. Técnicas de separación, vol. II*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Mahmoud M.M. y F.V. Kosikowski** (1982). Alcohol and single cell protein production by *Kluyveromyces* in concentrated whey permeates with reduced ash. *J. Dairy Sci.*, **65**: 2082-2087.
- Mahoney R.R. y J.R. Whitaker** (1978). Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.*, **43**: 584-591.
- Mahoney R.R., T.A. Nickerson y J.R. Whitaker** (1974). Selection of strains, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.*, **58**: 1620-1629.
- Maiorella B.L. y F.J. Castillo** (1984). Ethanol, biomass, and enzyme production for whey waste abatement. *Process Biochem.*, agosto: 157-161.
- Maillo A.** (1998). Tecnologías para el tratamiento de los residuos sólidos. En *Jornadas de Innovación tecnológica en el sector medioambiental: Tecnologías para el tratamiento de residuos sólidos*. Madrid.
- Malaspina F., C.M. Cellamare, L. Stante y A. Tilche** (1996). Anaerobic treatment of cheese whey with a downflow-upflow hybrid reactor. *Bioresource Technol.*, **55**: 131-139.
- Malaspina F., L. Stante, C.M. Cellamare y A. Tilche** (1995). Cheese whey and cheese factory wastewater treatment with a biological anaerobic-aerobic process. *Water Sci. Tech.*, **32** (12): 59-72.
- Mangino M.E.** (1992). Properties of whey protein concentrates. En *Whey and lactose processing*, pp. 231-270. Zadow J.G. (ed). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Mann E.** (1998a). Cheese –the world market. *Dairy Ind. Int.*, **63** (4): 15-16.
- Mann E.** (1998b). Dairy wastes. *Dairy Ind. Int.*, **63** (7): 15-16.
- Mann E.** (1997a). Whey utilization. Part 1. *Dairy Ind. Int.*, **62** (3): 17-18.
- Mann E.** (1997b). Whey utilization. Part 2. *Dairy Ind. Int.*, **62** (4): 14-15.
- Mann E.** (1996). Dairy beverages. *Dairy Ind. Int.*, **61** (5): 21-23.

- Mann E.** (1993). Dairy wastes. *Dairy Ind. Int.*, **58** (2): 17-18.
- Mann E.** (1979). Dairy effluents. *Dairy Ind. Int.*, **42** (6.): 21-23.
- Mannapperuma J.D.** (1996). Residual management in fruit processing plants. En *Processing Fruits: Science and Technology. Vol 1. Biology, principles, and applications*, pp. 461-500. L.P. Somogyi, H.S. Ramaswamy y Y.H. Hui (eds.). Ed. Technomic Publishing, Lancaster.
- Manz W., M. Wagner, R. Amann y K-H. Schleifer** (1994). *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Res.*, **28**: 1715-1723.
- MAPA** (1998a). *Boletín Mensual de Estadística*, 12: 51.
- MAPA** (1998b). *La alimentación en España*. Ed. Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación.
- MAPA** (1997). *Anuario español de estadísticas 1997*. Ed. Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Marshall V.M., W.M. Cole y B.E. Brooker** (1984). Observations on the structure of kefir grains and distribution of the microflora. *J. Appl. Bacteriol.*, **57**: 591-597.
- Martínez S.B. y R.A. Speckman** (1988). β -galactosidase treatment of frozen dairy product mixes containing whey. *J. Dairy Sci.*, **71**: 893-900.
- Martínez Nieto L., M.V. Moreno Romero y C. Lobillo Río** (1998). Estado actual del aprovechamiento de los residuos del olivar y de la industria del aceite de oliva. En *V Congreso Internacional de Química de la ANQUE: Residuos Sólidos, Líquidos y Gaseosos: su mejor destino (III)*, Tenerife.
- Marwaha S.S. y J.F. Kennedy** (1988). Review: Whey-pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **23**: 323-336.
- Marwaha S.S. y J.F. Kennedy** (1984). Alcohol production from whey permeate by immobilized and free cells of *Kluyveromyces marxianus* NCYC 179. *Process Biochem.*, **19**: 79-80.
- Marwaha S.S., J.F. Kennedy, H.K. Tewari y A. Redhu.** (1989). Characterization and treatment of dairy effluents by free and immobilized yeast. *Process Biochem.*, **24**: 46-51.
- Marwaha S.S., J.F. Kennedy y K. Seghal** (1988a). Simulation of process conditions of continuous ethanol fermentation of whey permeate using alginate entrapped *Kluyveromyces marxianus* NCYC 179 cells in a packed-bed reactor system. *Process Biochem.*, **23**: 17-22.

- Marwaha S.S., J.F. Kennedy, H.K. Tewari y A. Redhu.** (1988b). Development of non-conventional technology employing immobilized yeast cells for the treatment of dairy industry effluents. *Int. Ind. Biotechnol.*, **8**: 17-23.
- Marwaha S.S., J.F. Kennedy y R.P. Sethi** (1983). Vitamin B12 production from whey and simulation of optimal cultural conditions. *Process Biochem.*, **18**: 24-27.
- Masaguer A.** (1998). Utilización de residuos sólidos en agricultura. En *Jornadas de Innovación tecnológica en el sector medioambiental: Tecnologías para el tratamiento de residuos sólidos*. Madrid.
- Mathur B.N. y K.M. Shahani** (1979). Use of total whey constituents for human food. *J. Dairy Sci.*, **62**: 99-105.
- Matveeva I.V., R.D. Polandova y L.I. Puchkova** (1983). Effectiveness of β -galactosidase in the preparation of bread from wheat flour. *Khlebopek. Konditer. Prom-st.*, **6**: 29-32.
- Mavropoulou I.P. y F.V. Kosikowski** (1973). Free amino acids and soluble peptides of whey powders. *J. Dairy Sci.*, **56**: 1135-1138.
- Mawson A.J.** (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technol.*, **47**: 195-203.
- Mc Donald P., R.A. Edwards y J.F.D. Greenhalgh** (1981). *Nutrición animal*, (3ª ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- Melcher K.** (1997). Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a paradigm for eukariotic gene regulation. En *Yeast sugar metabolism*, pp. 235-270. Zimmermann F.K. y K-D. Entian (eds.). Ed. Technomic, Lancaster.
- Metcalf y Eddy, Inc.** (1998). *Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización*, (3ª ed.) Ed. Mc Graw-Hill, Madrid.
- Meyer S.A., D.G. Ahearn y D. Yarrow** (1984). Genus 4. *Candida* Berkhout. En *The Yeasts. A taxonomic study*, (3ª ed.), pp. 585-844. Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.). Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Michel A., F. Jacob, J. Perrier y S. Poncet** (1987). Yeast production from crude sweet whey. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 780-783.
- Mickle J.B., N. Smith, D. Halter y S. Knight** (1974). Performance and morphology of *Kluveromyces fragilis* and *Rhodotorula gracilis* grown in Cottage cheese whey. *J. Milk Food Technol.*, **37**: 481-484.
- Miki B.L.A., N. Hung Poon, A. P. James y V.L. Seligy** (1982a). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **150**: 878-889.

- Miki B.L.A., N. Hung Poon y V.L. Seligy** (1982b). Repression and induction of flocculation interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **150**: 890-899.
- Mill P.J.** (1964). The nature of the interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **35**: 61-68.
- Miller M.W.** (1979). Yeasts in food spoilage: an update. *Food Technol.*, **33** (1): 76-80.
- Miller K.S., S.K. Upadhayaya y J.M. Krochta** (1998). Permeability of *d*-limonene in whey protein films. *J. Food Sci.*, **63**: 244-247.
- MMA** (1996). *Elaboración y puesta en marcha del plan y programas de regularización de vertidos del sector de la industria de la alimentación. Tomo XII. Fabricación de productos lácteos*. Ed. Ministerio de Medio Ambiente.
- Ministerio de Sanidad y Consumo** (1985). *Análisis de alimentos. Métodos oficiales y recomendados por el Centro de Investigación y Control de Calidad*. Ed. Servicio de publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- Mino T.** (1995). Survey on filamentous micro-organisms in activated sludge processes in Bangkok, Thailand. *Water Sci. Technol.*, **31**: 193-202.
- Modler H.W.** (1982). Wiping out our whey woes. *Cult. Dairy Prod. J.*, **17**: 11-14.
- Monroy O., F. Vázquez M., J.C. Derramadero y J.P. Guyot** (1995). Anaerobic-aerobic treatment of cheese wastewater with national technology in Mexico: the case of "El Sauz". *Water Sci. Technol.*, **32** (12): 149-156.
- Monroy O., K.A. Johnson, A.D. Wheatley, F. Hawkes y M. Caine** (1994). The anaerobic filtration of dairy waste: of a pilot trial. *Bioresource Technol.*, **50**: 243-251.
- Montero M., B.R. Aguilar y H.S. García** (1998). Addition of fermented whey as ripening aid in mexican Manchego-type cheese. *J. Dairy Sci.*, **80** (Suppl, 1): 101.
- Moon N.J.** (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.*, **55**: 453-460.
- Moresi M. y E. Sebastiani** (1979). Optimization of whey fermentation in a shake-flask fermenter. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**: 63-71.
- Moresi M. A. Colicchio y F. Sansovini** (1980a). Optimization of whey fermentation in a jar fermenter. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**: 173-183.
- Moresi M. A. Colicchio, F. Sansovini y E. Sebastiani** (1980b). Chemical oxygen demand reduction in a whey fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**: 261-274.
- Morgan J.W., L.M. Evison y C.F. Forster** (1991). Changes to the microbial ecology in anaerobic digester treating ice-cream wastewater during start-up. *Water Res.*, **25**: 639-653.

- Morr C.V. (1992). Whey utilization. En *Whey and lactose processing*, pp. 133-156. Zadow J.G. (ed.). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Morr C.V. y L. Barrantes (1998). Lactose-hydrolyzed Cottage cheese whey nanofiltration retentate in ice cream. *Milchwissenschaft*, **53** (10): 568-571.
- Morr C.V. y E.Y.W. Ha (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**: 431-476.
- Moulin G., M. Legrand y P. Galzy (1983a). The importance of residual aerobic fermentation in aerated medium for the production of yeast from glucidic substrates. *Process Biochem.*, **18** (7): 5-8.
- Moulin G., B. Malige y P. Galzy (1983b). Balanced flora of an industrial fermenter production of yeast from whey. *J. Dairy Sci.*, **66**: 21-28.
- Moulin G., B. Malige y P. Galzi (1981). Etude physiologique de *Kluyveromyces fragilis* conséquence pour la production de levure sur lactosérum. *Lait*, **61**: 323-332.
- Moya Mora A. y J. Fuertes González (1996). Eliminación del poder contaminante de sueros de quesería. *ILE*, nov: 31-33.
- Mozaffar Z., K. Nakanishi y R. Matsuno (1985). Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Food Sci.*, **50**: 1602-1606.
- Murad H.A. (1998). Utilization of ultrafiltration permeate for production of β -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft*, **53** (5): 273-275.
- Nagashima M. (1990). Progress in ethanol production with yeasts. En *Yeast: biotechnology and biocatalysis*, pp. 57-84. Verachtest H. y R. De Mot (eds.). Ed. Marcel Dekker, London.
- Ndon U.J. y R.R. Dague (1997). Ambient temperature treatment of low strength wastewater using anaerobic sequencing batch reactor. *Biotechnol. Lett.*, **19**: 319-323.
- Neviani E., E. Forni, M.G. Bossi y S. Carini (1992). Microbiological composition of natural whey cultures for provolone cheese. *Scienza Tecn. Lattiero. Casearia*, **43**: 229-240.
- Niranjan K. y N.C. Shilton (1994). Food processing wastes – Their characteristics and an assessment of processing options. *AIChE Symp. Ser.*, **300** (90): 1-7.
- Núñez L.A., R. González, J.L. Cabezas y B. Martínez (1998). Aguas residuales de matadero. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, sept: 47-52.

- O'Learly V.S., R. Green, B.C. Sullivan y V.H. Holsinger (1977a). Alcohol production by selected yeast strains in lactase-hydrolyzed acid whey. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**: 1019-1035.
- O'Learly V.S., C. Sutton, M. Bencivengo, B.C. Sullivan y V.H. Holsinger (1977b). Influence of lactose hydrolysis and solids concentration on alcohol production by yeast in acid whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**: 1689-1702.
- Ockerman H.W. y C. L. Hansen (1994). *Industrialización de subproductos de origen animal*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Olano A., M. Ramos y I. Martínez-Castro (1983). Enzymatic activities of Maxilact. *Food Chem.*, **10**: 57-67.
- Onishi N. y T. Tanaka (1998). Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmatomyces elviae* CBS 8119. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**: 136-139.
- Onishi N. y T. Tanaka (1997). Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 82-86.
- Onishi N. y K. Yokozeki (1996). Gluco-oligosaccharide and galacto-oligosaccharide production by *Rhodotorula minuta* IFO 879. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**: 124-127.
- Onishi N., I. Kira y K. Yokozeki (1996). Galacto-oligosaccharides production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS 6803. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**: 253-256.
- Ordolff D. (1997). Reduction of chemical oxygen demand in dairy effluents. *DMZ Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, **117**: 1118-112.
- Ordoñez J.A. (1979). Random number sampling method for estimation of lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **46**: 351-353.
- Ouwehand A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En *Lactic acid bacteria*, (2nd ed.), pp. 139-160. Salminen S. y A. von Wright (eds.). Ed. Marcel Dekker, New York.
- Patel P. y D. Madamwar (1998). Surfactants in anaerobic digestion of salty cheese whey using upflow fixed film reactor for improved biomethanation. *Process Biochem.*, **33**: 199-203.
- Patel C. y D. Madamwar (1997). Biomethanation of salty cheese whey using an anaerobic rotating biological contact reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**: 502-504.
- Patel P., M. Desai y D. Madamwar (1995). Biomethanation of cheese whey using anaerobic upflow fixed film reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, **79**: 398-399.

- Paterson I. y P.J. Cooke** (1998). El agua y el tratamiento de los efluentes en la elaboración de zumos. En *Producción y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gas*, (2ª ed.), pp. 373-406. Ashurst P.R. (ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- Paul A.A. y D.A.T. Southgate** (1978). *McCance and Widdowson's. The composition of foods*, (4th ed.). Ed. HMSO, London.
- Pazur J.H.** (1953). The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharides. *Science*, **117**: 335-337.
- Pearce R.J.** (1992). Whey processing. En *Whey and lactose processing*, pp. 271-317. Zadow J.G. (ed.). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Peciulis J., A.K. Kulikova y A.S. Tikhomirova** (1982). Cultivation of feed yeasts on substrates with milk whey treated with β -galactosidase. *Gidroliz. Lesokhim. Prom-st*, **3**: 13-16.
- Peciulis J., A.S. Tikhomirova y A.K. Kulikova** (1979). Cultivation of bakers' yeast on molasses containing β -galactosidase treated whey. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **15**: 353-359.
- Pedrique M. y F.J. Castillo** (1982). Regulation of β -galactosidase synthesis in *Candida pseudotropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 303-310.
- Pennington N.L. y C.W. Baker** (1989). *Sugar. A User's Guide to sucrose*. Ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Percheron G., N. Bernet y R. Moletta** (1997). Start-up anaerobic digestion of sulfate wastewater. *Bioresource Technol.*, **61**: 21-27.
- Pereda J., P. Alvarez, A. Morillo, E. Guillen y F. Romero** (1996). Depuración aerobia de un agua residual láctea. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **10/96**: 107-111.
- Pereda J., F. Romero y P. Alvarez** (1991). Depuración aerobia de vertidos lácteos de alta alcalinidad. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **1/91**: 133-138.
- Perle M., S. Kimchie y G. Shelef** (1995). Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Water Res.*, **29**: 1549-1554.
- Petrui R. y G. Lettinga** (1997). Treatment of milk-fat emulsion. *Bioresource Technol.*, **61** (12): 141-149.
- Piard J.C. y M. Desmazeaud** (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, **72**: 113-142.
- Piard J.C. y M. Desmazeaud** (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, **71**: 525-541.

- Pipyn P. y W. Verstraete (1981). Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 1145-1154.
- Pivarnik L.F., A.G. Senecal y A. G. Rand (1995). Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial β -galactosidase (lactase) in food processing. *Adv. Food. Nutr. Res.*, **38**: 1-102.
- Polandova R.D., Matveeva I.V., L.I. Puchkova y A.S. Tikhomirova (1983). Effectiveness of using whey in the production of wheat bread. *Khlebopek. Konditer. Prom-st.*, **1**: 33-36.
- Pomeranz Y. (1964). Lactase (β -galactosidase): II. Possibilities in the food industries. *Food Technol.*, **18**: 96-103.
- Porro D., E. Martegani, B.M. Ranzi y L. Aberghina (1992). Lactose/whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**: 799-805.
- Poutanen K., Y-Y. Linko y P. Linko (1978). Treatment of hydrolyzed whey lactose syrup with immobilized glucose isomerase for increased sweetness. *Milchwissenschaft*, **33**: 435-438.
- Poyton R.O. y P.V. Burke (1992). Oxygen regulated transcription of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase genes in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1101**: 252-256.
- Pozo M.G. (1999). Análisis de la industria agroalimentaria y cárnica en España. *Eurocarne*, **74**: 17-23.
- Prakasam T.B.S. y N.C. Dondero (1967). Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge. I. Enumeration. *Appl. Microbiol.*, **15**: 461-467.
- Praphailong W. y G.H. Fleet (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.*, **14**: 459-468.
- Praphailong W., M. Van Gestel, G.H. Fleet y G.M. Heard (1997). Evaluation of the Biolog system for identification of food and beverage yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 455-459.
- Prenosil J.E., E. Stuker y J.R. Bourne. (1987a). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of Art. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 1019-1025.
- Prenosil J.E., E. Stuker y J.R. Bourne. (1987b). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: Part II: Experimental. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**: 1026-1031.
- Ramakrishnan S. y B. Hartley (1993). Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 4230-4235.

- Ramalho R.S.** (1991). *Tratamiento de aguas residuales*. Ed. Reverté, Barcelona.
- Ramaswamy H.S. y C. Abbatemarco** (1996). Thermal processing of fruits. En *Processing Fruits: Science and Technology. Vol 1. Biology, principles, and applications*, pp. 25-66. L.P. Somogyi, H.S. Ramaswamy y Y.H. Hui (eds.). Ed. Technomic Publishing, Lancaster.
- Ramos-Cormenzana A., A. Castillo, C. Incerti y L.F. Gómez-Palma** (1994). Bacteriological indicators of faecal contamination: result of a loading experiment with untreated urban wastewater. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 95-99.
- Rapin J-D, I.W. Marison, U. von Stockar y P.J. Reilly** (1994). Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 143-150.
- Reesen L. y R. Strube** (1978). Complete utilization of whey for alcohol and methane production. *Process Biochem.*, **13** (11): 21,22,24.
- Reinbold R.S. y J. Takemoto** (1988). Use of swiss cheese whey permeate by *Kluveromyces fragilis* and mixed culture of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Bacillus megaterium*. *J. Dairy Sci.*, **71**: 1799-1802.
- Reinheimer J.A., V.B. Suárez, N.B. Bailo y C.A. Zalazar** (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *J. Food Prot.*, **58**: 796-799.
- Reiss E.** (1985). Cell wall composition. En *Fungi pathogenic for humans and animals (in three parts). Part B. Pathogenicity and detection: II*, pp. 57-101. Howard D. H. (ed.). Ed. Amrcell and Dekker, New York.
- Renner E.** (1992). Nutritional aspects. En *Whey and lactose processing*, pp. 449-472. Zadow J.G. (ed.). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Reuter G.** (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **2**: 55-68.
- Richmond M.L., J.I. Gray y C. M. Stine** (1981). Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *J. Dairy Sci.*, **64**: 1759-1771.
- Robbins C.W. y G.A. Lehrs** (1998). Effects of acid cottage cheese whey on chemical and physical properties of a sodic soil. *Arid. Soil Res. Rehab.*, **6**: 127-134.
- Rodier J.** (1981). *Análisis de las aguas*. Ed. Omega, Barcelona.
- Rohm H., F. Eliskases-Lechner y M. Bräuer** (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**: 370-376.
- Roland J.F. y W.L. Alm** (1975). Wine fermentations using membrane processed hydrolyzed whey. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**: 1443-1453.

- Romano p., L. Grazia, G. Suzzi y P. Giudici (1989). The yeasts in cheese-making. *Yeast*, Spec. Iss.: S151-S155.
- Ronzano E. y J.L. Dapena (1995). *Tratamiento biológico de las aguas residuales*. Ed. Diaz de Santos, Madrid.
- Roostita R. y G.H. Fleet (1997). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**: 393-404.
- Rose A. H. (1982). *Fermented foods*. Ed. Academic Press, London.
- Rosenberg M., P. Fitzgerald y S-J. Lee (1998). Microstructure of whey protein-based, water-insoluble microcapsules. *J. Dairy Sci.*, **81** (supl): 2.
- Rouwenhorst R.J., J.T. Pronk y J.P. van Dijken (1989). The discovery of β -galactosidase. *TIBS*, **14**: 416-418.
- Rubio-Teixeira M., J.I. Castrillo, A.C. Adam, U.O. Ugalde y J. Polaina (1998). Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**: 827-837.
- Rusten B., A. Lundar, O. Eide y H. Odegaard (1993). Chemical pretreatment of dairy wastewater. *Water Sci. Technol.*, **28**: 67-76.
- Sánchez L. y F.J. Castillo (1980). Producción, extracción y caracterización parcial de β -D-galactosidasa de *Kluveromyces fragilis* crecida en suero de leche. *Acta. Cient. Venez.*, **31**: 154-159.
- Sanford P.A. (1982). *Digestive system physiology*. Ed. Edward Arnold, London.
- Sarais I., D. Piussi, V. Aquili y M.L. Stecchini (1996). The behaviour of yeast populations in Stracchino cheese packaged under various conditions. *J. Food Prot.*, **59**: 541-544.
- Savaiano D.A. (1993). Lactose intolerance: dietary management. Proceedings of the 1st World Congress of dairy products in human health and nutrition, 401-405.
- Schmidt J.L., C. Graffard y J- Lenoir (1979). Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de camembert. *Lait*, **583-584**: 142-163.
- Schmidt-Kastner G. y C.F. Gölker (1987). Downstream processing in biotechnology. En *Basic Biotechnology*, pp. 173-193. Bu'lock J. y B. Kristiansen (eds.). Ed. Academic Press, London.
- Schoutens G.H. y W.J. Groot (1985). Economic feasibility of the production of iso-propanol-butanol-ethanol fuels from whey permeate. *Process Biochem.*, **20**: 117-121.
- Schroder E.W., y J. De Haast (1989). Anaerobic digestion of deproteinated cheese whey in an upflow sludge-blanket reactor. *J. Dairy Res.*, **56**. 129-139.

- Schulz B. y M. Höfer** (1986). Utilization of lactose in non-respiring cells of the yeast *Debaryomyces polymorphus*. *Arch. Microbiol.*, **145**: 367-371.
- Schütte H. y M-R. Kula** (1988). Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme Microb. Technol.*, **10**: 552-558.
- Schwan R.F. y A.H. Rose** (1994). Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 62-67.
- Seiler D.A.L.** (1985). Monitoring mycological media. *Int. J. Food Microbiol.*, **2**: 123-131.
- Seiler H. y M. Busse** (1990). The yeasts of cheese brines. *Int. J. Food Microbiol.*, **11**: 289-304.
- Selmer-Olsen E. y T. Sørhaug** (1998). Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. *Milchwissenschaft*, **53** (7): 367-370.
- Serrano C.E., C. García, J.E. Pardo, R. Jordano, L.M. Medina y M. Jodral** (1996). Caracterización de levaduras aisladas de queso manchego con denominación de origen. *Alimentaria*, jul-ago: 65-67.
- Serrano R., J.M. Gancedo y C. Gancedo** (1973). Assay of yeast enzymes *in situ*. A potential tool in regulation studies. *Eur. J. Biochem.*, **34**: 479-482.
- Shay L.K. y G.H. Wegner** (1986). Nonpolluting conversion of whey permeate to food yeast protein. *J. Dairy Sci.*, **69**: 676-683.
- Sherman F., G.R. Fink y J.B. Hicks** (1983). *Methods in yeast genetics. A laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sherwin C.P., D.E. Smith y R.G. Fulcher** (1998). The water vapour barrier properties of whey protein-fatty acid emulsion films. *J. Dairy Sci.*, **81** (Suppl, 1): 23.
- Sheu T-Y. y M. Rosenberg** (1998). Microestructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *J. Food Sci.*, **63**: 491-494.
- Sheu D-C., S-Y Li, K-J. Duan y C.W. Chen** (1998). Production of galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads. *Biotechnol. Tech.*, **12**: 273-276.
- Shukla T.P.** (1975). Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, **1**: 325-356.
- Sierra Antiñolo J. y L. Peñalver Camara** (1989). *La reutilización de las aguas residuales: acondicionamiento y uso*. Ed. Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, Madrid.

- Sims A.P., E. Kopetzki, B. Schulz y J.A. Barnett (1984). The use of phenolic glycosides for studying the aerobic or anaerobic transport of disaccharides into yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 1933-1940.
- Singh D., P. Nigam, I.M. Banat, R. Marchant y A.P. McHale (1998). Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part II. Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**: 823-834.
- Singh V., C.C. Hsu, D.C. Chen y C.H. Tzeng (1983). Fermentation processes for dilute food and dairy wastes. *Process Biochem.*, **18** (2): 13-17, 25.
- Siso M.I.G. (1994). β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. *Process Biochem.*, **29**: 565-568.
- Siso M.G.I., A. Freire, E. Ramil, E.R. Belmonte, A.R. Torres y E. Cerdán (1994). Covalent immobilization of β -galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistance. *Process Biochem.*, **29**: 7-12.
- Somkuti G.A. y D.H. Steinberg (1994). Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and the expression of beta-galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 573-576.
- Sonawat H.M., A. Agrawal y S.M. Dutta (1981). Production of the β -galactosidase from *Kluveromyces fragilis* grown on whey. *Folia Microbiol.*, **26**: 370-376.
- Sorlini C. y D. Daffonchio (1995). Produzione di acidi grassi volatili per fermentazione con propionibatteri di siero di latte deproteinato addizionato di estratto di lievito. *Latte*, **20**: 290-292.
- Sorlini C., D. Daffonchio y G. Ranalli (1993). Fermentazioni del siero di latte con recupero di acidi organici, idrogeno e abbattimento del COD. *Latte*, **18**: 90-91.
- Spreer E. (1991). *Lactología industrial*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Stafford D.A. (1992). Anaerobic fermentation. *J. Soc. Dairy Technol.*, **45** (3): 84-89.
- Stineman T.L., J.D. Edwards y J.C. Grosskopf (1978). Bakers' yeast from acid whey. Patente.
- Stover E.L. (1993). Control of opportunistic filamentous bacteria in activated sludge treatment of food processing wastewaters. *AIChE Symp. Ser.*, **300** (90): 42-47.
- Stratford M. (1989a). Yeast flocculation: The influence of agitation. *Yeast*, **5**: S97-S102.
- Stratford M. (1989b). Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **5**: S441-S445.
- Stratford M. y B.M. Pearson (1992). Lectin-mediated flocculation of the yeast *Saccharomycodes ludwigii* NCYC 734. *Lett. Appl. Microbiol.*, **14**: 214-216.

- Stratford M. y A. Assinder** (1991). Yeast flocculation: Flo 1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*, **7**: 559-574.
- Stred'anský M., M. Tomáška, E. Sturdík y L. Kremnický** (1993). Optimization of β -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**: 1063-1065.
- Strydom J.P., T.J. Britz y J.F. Mostert** (1997). Two-phase anaerobic digestion of three different dairy effluents using a hybrid bioreactor. *Water SA*, **23**: 151-156.
- Suria Guasch F.** (1996). Secado de orujo de aceituna procedente de decanter de "dos fases". *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **8/96**: 121-126.
- Suriyarachchi V.R. y G.H. Fleet** (1981). Occurrence and growth of yeasts in yogurts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**: 574-579.
- Tamime A.Y. y V.M.E. Marshall** (1997). Microbiology and technology of fermented milks. En *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, pp. 57-152. Law B.A. (ed.). Ed. Blackie Academic and Professional, London.
- Tanaka R., H. Takayama, M. Morotomi, T. Kuroshima, S. Ueyama, K. Matusmoto, A. Kuroda y M. Mutai** (1983). Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **2**: 17-24.
- Tarbox M.** (1993). Effluents from food processing (Composition and analysis). En *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Vol. 3, pp. 1514-1529. Macrae R., R.K. Robinson y M.J. Sadler (eds.). Ed. Academic Press, London.
- Tartakovsky B., I. Petti, J. Hawari y S.R. Guiot** (1998). Immobilization of anaerobic sludge using chitosan crosslinked with lignosulfonate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **20**: 45-47.
- Thakar P.N., S.H. Vyas, P. S. Prajapati, K.G. Upadhyay y R.V. Miyani** (1988). Lactose prehydrolysis of buffalo milk β -D-galactosidase in order to accelerate ripening of Cheddar cheese. I. Manufacture of Cheddar cheese. *Cult. Dairy. Prod. J.*, **23** (1): 20-21, 23-24.
- Thakar P.N., S.H. Vyas, P. S. Prajapati, R.V. Miyani y K.G. Upadhyay** (1992). Lactose prehydrolysis of buffalo milk β -D-galactosidase in order to accelerate ripening of Cheddar cheese. I. Ripening of Cheddar cheese. *Cult. Dairy. Prod. J.*, **27** (3): 6-9.
- Thomsen B.** (1995). Whey protein texturizer. *Food Technol. Int. Eur.*: 39-42.
- Toba T., I. Hayasaka, S. Taguchi y S. Adachi** (1990). A new method for manufacture of lactose-hydrolyzed fermented milk. *J. Sci. Food Agric.*, **52**: 403-407.
- Tomomatsu H.** (1994). Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.*, **48**: 61-65.

- Tong S.L.** (1995). Wastewater monitoring. En *Waste treatment plants*, pp. 17-28. Sastry C.S., M.A. Hashim y P. Agamuthu (eds.). Ed. John Wiley and Sons, Nueva Deli.
- Troller J.A.** (1993). *Sanitation food processing*, (2ª ed.). Ed. Academic Press.
- Uceda Ojeda M., M. Hermoso Fernández y J. González Delgado** (1995). Evolución de la tecnología de extracción del aceite de oliva (I). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **3/95**: 75-80.
- Urcelay R.** (1998). Principios de fermentación anaerobia y aprovechamiento del biogás. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **10/98**: 117-123.
- Valles E. y E. Moquot** (1972). Etude sur la technique de préparation de la présure utilisée dans les fabrications traditionnelles des fromages de gruyère de Comté et d'Emmental. *Lait*, **52**: 259-282.
- Vallés S., A. Flors, J.L. Lequerica y A. Madarro** (1980). Producción de metano por fermentación anaerobia. I. Descripción del proceso. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **20**: 189-208.
- van der Broek P. J.A. y J. van Steveninck** (1982). Kinetic analysis of H⁺/methyl- β -D-thiogalactoside symport in *Saccharomyces fragilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **693**: 213-220.
- van der Walt J.P** (1971). Criteria and methods used in classification. En *The Yeasts. A taxonomic study*, (2nd ed.), pp. 34-113 Lodder J. (ed.). Ed. North-Holland, Amsterdam.
- van der Walt J.P. y E. Johannsen** (1984). Genus 13. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. En *The Yeasts. A taxonomic study*, (3rd ed.), pp. 224-251. Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.). Ed. Elsevier, Amsterdam.
- van der Walt J.P. y D. Yarrow** (1984). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. En *The Yeasts. A taxonomic study*, (3rd ed.), pp. 45-104. Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.). Ed. Elsevier, Amsterdam.
- van Uden N. y H. Buckley** (1971). Genus 2. *Candida* Berkhout. En *The Yeasts. A taxonomic study*, (2nd ed.), pp. 893-1087. Lodder J. (ed.). Ed. North-Holland, Amsterdam.
- Vananuvat P. y J.E. Kinsella** (1975). Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. Batch culture studies. *J. Food Sci.*, **40**: 336-341.
- Varela H., M.D. Ferrari, L. Loperena y C. Lareo** (1992). Effect of aeration rate on the alcoholic fermentation of whey by *Kluyveromyces fragilis*. *Microbiologia SEM*, **8**: 14-20.
- Varnam A.H. y J.P. Sutherland** (1997). *Bebidas: tecnología, química y microbiología (Serie Alimentos básicos 2)*. Ed. Acribia, Zaragoza.

- Veiga M.C., R. Méndez y J.M. Lema** (1994). Waste water treatment for fisheries operations. En *Fisheries processing: biotechnological applications*, pp. 344-369. Martin A.M. (ed.). Ed. Chapman and Hall, London.
- Vienne P. y U. von Stockar** (1985). An investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate by *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.*, **7**: 521-526.
- Viljoen B.C. y T. Greyling** (1995). Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**: 79-88.
- Villani F., O. Pepe, G. Moschetti, G. Salzano, E. Parente y S. Coppola** (1995). Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from natural whey starters for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. *Ital. J. Food. Sci.*, **3**: 221-234.
- Viraraghavan T. y R. Varadarajan** (1996). Low-temperature kinetics of anaerobic-filter wastewater treatment. *Bioresource Technol.*, **57**: 165-171.
- Vogt E.** (1984). *El vino: Obtención, elaboración y análisis*, (2ª ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- Walker H.W. y W.S. LaGrange** (1983). Sanitation in food manufacturing operations. En *Desinfection, sterilization and preservation*. Lea y Febiger (eds.). Filadelfia.
- Walker H.W. y J.C. Ayres** (1970). Yeasts as spoilage organisms. En *The yeast. vol. 3. Yeast technology*, H.A. Rose y J.S. Harrison (eds.). Ed. Academic Press, London.
- Walstra P. y R. Jenness** (1987). *Química y física lactológica*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Wasserman B.P.** (1984). Thermostable enzyme production. *Food Technol.*, **38**: 78-89, 98.
- Wasserman A.E.** (1960). Whey utilization IV. Availability of whey nitrogen for the growth of *Saccharomyces fragilis*. *J. Dairy Sci.*, **43**: 1231-1234.
- Wasserman A.E., W.J. Hopkins y N. Porges** (1958). Whey utilization. Growth conditions for *Saccharomyces fragilis*. *Sewage Ind. Waste*, **30**: 913-920.
- Watari J., Y. Takata, M. Ogawa, H. Sahara, S. Koshino, M-L Onnela, U. Airaksinen, R. Jaatinen, M. Penttilä y S. Keränen** (1994). Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast*, **10**: 211-225.
- Watari J., Y. Takata, M. Ogawa, J. Murakami y S. Koshino** (1991). Breeding of flocculation industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains by introducing the flocculation gene *FLO1*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 1547-1552.
- Welthagen J.J. y B.C. Viljoen** (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int. J. Food Microbiol.*, **41**: 185-194.

- Welthagen J.J. y B.C. Viljoen** (1997). The value of certain chemotaxonomic methods in the identification of food related yeasts. *Food Microbiol*, **14**: 231-245.
- Wendorff W.L.** (1998). Treatment of dairy wastes. En *Applied dairy microbiology*, pp. 461-484. Marth E.H. y J.L. Steele (eds.). Ed. Marcell and Dekker, New York.
- Wendorff W.L. y C.H. Amundson** (1971). Characterization of beta-galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.*, **34**: 300-306.
- Wendorff W.L., C.H. Amundson, N.F. Olson y J.C. Garver.** (1971). Use of yeast Beta-galactosidase in milk and milk products. *J. Milk Food Technol.*, **34**: 294-299.
- Wendorff W.L., C.H. Amundson, N.F. Olson** (1970). Nutrient requirements and growth conditions for production of lactase enzyme by *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.*, **33**: 451-455.
- Wésolowski-Louvel M., K.D. Breuning y H. Fukuhara** (1996). *Kluyveromyces lactis*. En *Nonconventional yeasts in biotechnology*, pp. 139-202. Wolf K. (ed.). Ed. Springer, Berlín.
- Westall S. y O. Filtenborg** (1998a). Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiol.*, **15**: 215-222.
- Westall S. y O. Filtenborg** (1998b). Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiol.*, **15**: 243-249
- Weusthuis R.A., J.T. Pronk, P.J.A. van den Broek y J.P. van Dijken** (1994). Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Rev.*, **58**: 616-630.
- Wheatland A.B.** (1974). Treatment of waste waters from dairies and dairy-product factories –Methods and systems. *J. Soc. Dairy Technol*, **27** (2): 71-79.
- Wheatley A.D.** (1994). Water pollution in the food industry: sources, control and cost implications. En *Food industry and the environment. Practical issues and cost implications*, pp. 137-258. Dalzell J.M. (ed.). Ed. Blackie Academic and Professional, London.
- Wickerham L.J.** (1951). Taxonomy of yeasts. *Techn. Bull U.S. Dept. Agric.*, **1029**: 1-56.
- Wiebe Visser W., A. Scheffers, W.H. Batenburg-van der Vegte y J.P. van Dijken** (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 3785-3792.
- Woese C.R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**: 221-271.
- Wyder M.-T. y Z. Puhan** (1999). Investigation of the yeast flora in smear ripened cheeses. *Milchwissenschaft*, **54** (6): 330-33.

- Yacubowicz J.** (1996). El proceso ALKASAVE para recuperación de sosa cáustica y ácidos de las soluciones de limpieza de las industrias lácteas, cervecera y de bebidas en general. *Rev. Esp. Lech.*, **75**: 26-29.
- Yan J.Q., K.V. Lo y K. L. Pinder** (1993). Instability caused by high strength of cheese whey in a UASB reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**: 700-706.
- Yang S.T. y E.M. Silva** (1995). Novel products and new technologies for use of familiar carbohydrate, milk lactose. *J. Dairy Sci.*, **78**: 2541-2562.
- Yang S-T., I-C. Tang y M.R. Okos** (1988). Defined bacterial culture development for methane generation from lactose. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**: 28-37.
- Yildirim M. y N.S. Hettiarachchy** (1998). Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. *J. Food Sci.*, **63**: 248-252.
- Yip V., S.D. Arntfield y A.W. Hydamaka** (1996). Potential for stainless steel microfiltration processing to reduce effluent from a fluid milk and ice cream processing plant. *J. Dairy Sci.*, **79**: 710-716.
- Yu J. y K.L. Pinder** (1993a). Intrinsic fermentation kinetics of lactose in acidogenic biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**: 479-488.
- Yu J. y K.L. Pinder** (1993b). Utilization of volatile fatty acids in methanogenic biofilms. *Bioresource Technol.*, **46**: 241-250.
- Zadow J.G.** (1992). Lactose hydrolysis. En *Whey and lactose processing*, pp. 361-408. Zadow J.G. (ed.). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Zadow J.G.** (1984). Lactose: Properties and uses. *J. Dairy Sci.*, **67**: 2654-2679.
- Zall R.R.** (1992). Sources and composition of whey and permeate. En *Whey and lactose processing*, pp. 1-72. Zadow J.G. (ed.). Ed. Elsevier Applied Science, London.
- Zall R.R.** (1984). Trends in whey fractionation and utilization, a global perspective. *J. Dairy Sci.*, **67**: 2621-2629.
- Zárate S. y M.H. López-Leiva** (1990). Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literature review. *J. Food Prot.*, **53**: 262-268.
- Zhang L-B. y N.Y. Farkye** (1998). Solubility of heat-treated and enzyme hydrolyzed whey protein concentrate (WPC) at various pH. *J. Dairy Sci.*, **81** (supl): 3.
- Zoetemeyer R.J., J.C. van den Heuvel y A. Cohen** (1982). pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. *Water Res.*, **16**: 303-311.
- Zomer E., Z. Er-El y J.S. Rokem** (1987). Production of intracellular enzymes by enzymatic treatment of yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**: 281-284.

Zúñiga M.E., R. Chamy, H. Domínguez, M.J. Núñez y J.M. Lema (1995). Efecto del tiempo de tratamiento enzimático sobre la extractabilidad del aceite de colza y girasol. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **3/95**: 43-46.

***NORMATIVA
MEDIOAMBIENTAL CITADA***

Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. (BOE nº 189, 8/8/1985; corrección de errores en BOE nº 243, 10/10/1985).

Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico que desarrolla los títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de Aguas (BOE nº 103, 30/4/1986; corrección de errores en BOE nº 157, 2/7/1986).

Real Decreto 1315/1992, de 30 de octubre, por el que se modifica parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico que desarrolla los títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VI de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, aprobado por el Real Decreto 849/1986 (BOE nº 288, 1/12/1992).

Real Decreto 927/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, en desarrollo de los títulos II y III de la Ley de Aguas (BOE nº 209, 31/8/1988).

Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas (BOE nº 181, 29/7/1988).

Real Decreto 1471/1989, de 1 de diciembre, aprobando el Reglamento General para desarrollo y ejecución de la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas (BOE nº 297; 12/12/1989).

Directiva 91/271/CEE, del Consejo de 21 de mayo de 1991 sobre el Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas (DOCE nº L 135/40, 30/5/91).

Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las Normas aplicables al Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas (BOE nº 312, 30/12/1995).

Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las Normas aplicables al Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas (BOE nº 77, 29/3/1996).

Real Decreto 2116/1998, de 2 de octubre, por el que se modifica el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de Diciembre, por el que se establecen las Normas aplicables al Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas (BOE nº 251, 20/10/1998; corrección de erratas BOE nº 286, 30/11/1998).

Resolución de 28 de abril de 1995, de la secretaría de Estado de Medio Ambiente y Vivienda, por la que se dispone la publicación del Acuerdo del Consejo de Ministros de 17 de febrero de 1995, por el que se aprueba el Plan Nacional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales (BOE nº 113, 12/5/1995).

Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre los Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento (BOCAM nº269, 12/11/1993).

Directiva 96/61/CE, de 24 de septiembre, relativa al Control y Prevención Integrados de la Contaminación (IPPC) (DOCE nº L 257, 10/10/1996).

Directiva 91/156/CEE, del Consejo de 18 de marzo de 1991, por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE relativa a los Residuos (DOCE nº L 078; 26/3/1991).

Directiva 75/442/CEE, del Consejo de 15 de julio de 1975, relativa a los Residuos (DOCE nº L 194; 25/7/1975).

Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases (BOE nº 99, 25/4/1997).

Real Decreto 782/1998, de 30 de abril, por el que se aprueba el Reglamento para el desarrollo y ejecución de la ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases (BOE nº 104; 1/5/1998).

Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos (BOE nº 96; 22/4/98).

Real Decreto 2224/1993, de 17 de diciembre, sobre Normas Sanitarias de Eliminación y Transformación de Animales Muertos y Desperdicios de Origen Animal y Protección frente a Agentes Patógenos en Piensos de Origen Animal (BOE nº 16; 19/1/1994).

Resolución de 4 de julio de 1996, de la dirección General de Salud Pública, por la que se adoptan Medidas Urgentes de Supresión Cautelar de la Entrada de Determinados Productos de Animales Bovinos procedentes de Francia, Irlanda, Portugal y Suiza (BOE nº 178; 24/7/1996).

Ley 20/1986, de 14 de mayo, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos (BOE nº 120, 20/5/1986).

Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos (BOE nº 182, 30/7/1988).

Orden de 13 de octubre de 1989, por la que se determinan los Métodos de Caracterización de los Residuos Tóxicos y Peligrosos (BOE nº 270, 10/11/1989).

Real Decreto 952/1997, de 20 de junio, por el que se modifica el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, de 14 de mayo, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos, aprobado mediante Real Decreto 833/1988, de 20 de julio (BOE nº 160, 5/7/1997).

Ley 38/1972, de 22 de diciembre, de Protección del Ambiente Atmosférico (BOE nº 309; 26/12/1972).

Decreto 833/1975, de 6 de febrero, por el que se desarrolla la Ley 38/1972, de 22 de diciembre, de protección del Ambiente Atmosférico (BOE nº 96; 22/4/1975).

Orden de 10 de agosto de 1976, por la que se establecen la Normas Técnicas para el Análisis y Valoración de los Contaminantes de Naturaleza Química presentes en la Atmósfera (BOE nº 266; 5/11/1976).

Real Decreto 1088/1992, de 11 de septiembre, por el que se establecen nuevas Normas sobre la Limitación de Emisiones a la Atmósfera de determinados Agentes Contaminantes procedentes de Instalaciones de Incineración de Residuos Municipales (BOE nº 235; 30/9/1992).

Directiva 86/278/CEE, de 12 de junio, de protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la Utilización de los Lodos de Depuradora en Agricultura (DOCE nº L 181, 4/7/1986).

Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre de 1990, por el que se regula la Utilización de los Lodos de Depuradora (BOE nº 262, 1/10/1990).

Orden 26 de octubre de 1993, sobre Utilización de Lodos de Depuración en el sector agrario (BOE nº 265, 5/11/1993).25, 29/1/1968).